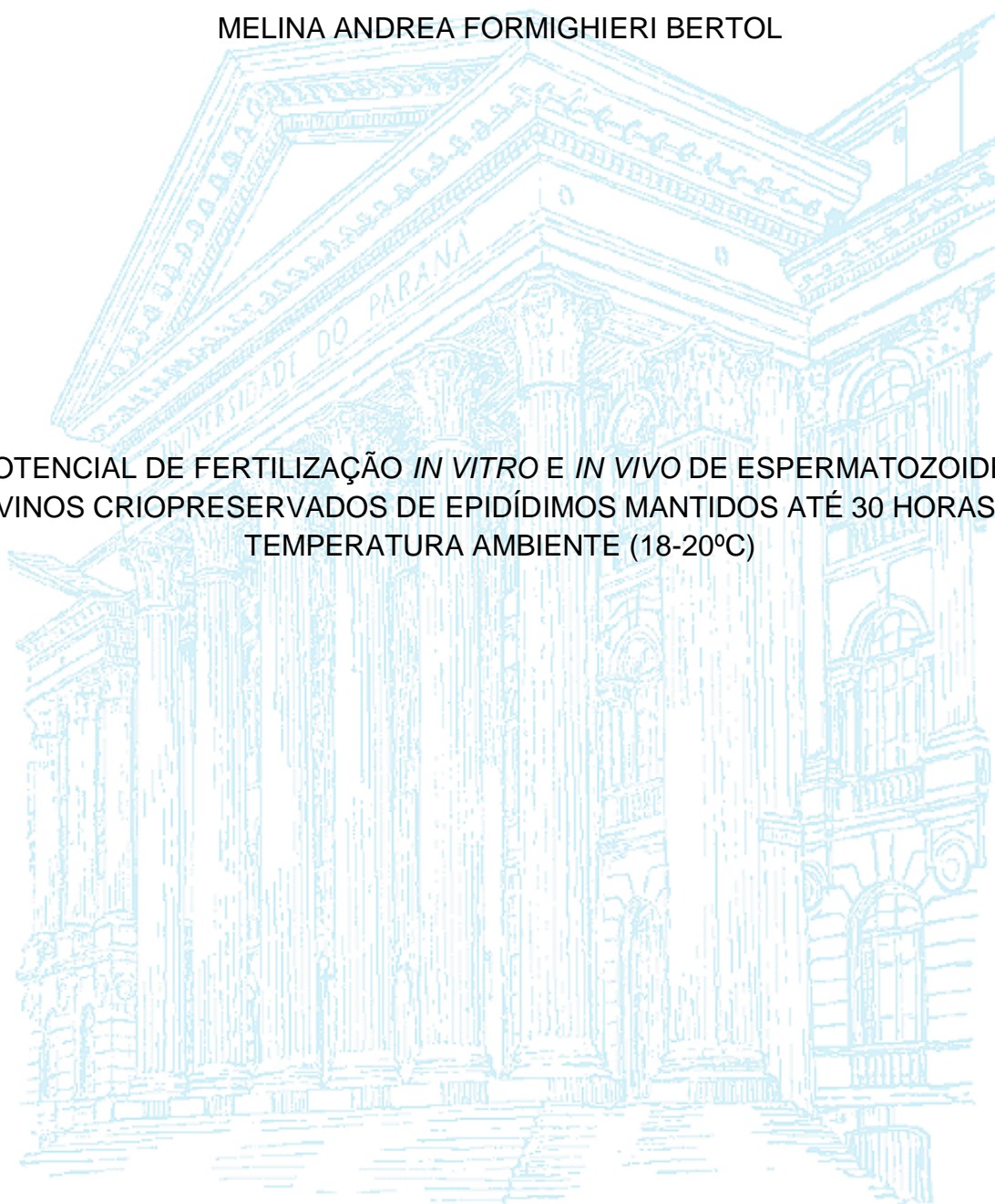


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL

POTENCIAL DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS CRIOPRESERVADOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS ATÉ 30 HORAS EM
TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C)



CURITIBA

2016

MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL

POTENCIAL DE FERTILIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS CRIOPRESERVADOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS ATÉ 30 HORAS EM
TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação
em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia,
Setor de Tecnologia, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

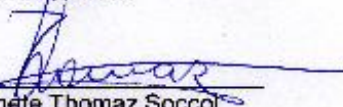
MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL

**"POTENCIAL DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
ESPERMATOZOÍDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS DE EPIDÍDIMOS
MANTIDOS ATÉ 30 HORAS EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C)".**

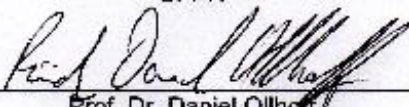
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:




Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Orientador - UFPR



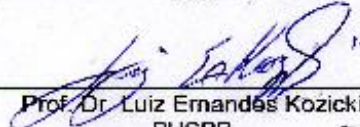
Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol
UFPR



Prof. Dr. Daniel Ollhoff
PUCPR



Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL



Prof. Dr. Luiz Emandes Kozicki
PUCPR

Curitiba, 03 de Março de 2016.

*Dedico esse trabalho a minha avó,
querida Evinha (Bibi) Haas Formighieri,
que não está mais entre nós, fisicamente. Amo você.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder-me a graça da vida e por ser o porto seguro nos momentos de dúvida. Obrigado por todas as vitórias e derrotas durante o percurso para chegar até aqui. Todas as minhas conquistas são dedicadas a ele com muita gratidão;

À toda minha família pelo apoio durante essa longa etapa. Especialmente aos meus pais, Margot e Moacir. Obrigado por me ensinarem os princípios e valores que hoje fazem parte do meu carácter. Vocês são tudo para mim. Mãe, obrigado por incentivar meus sonhos e caminhar ao meu lado sempre. Agradeço também a minha irmã Mariel e meu cunhado Bruno pela convivência diária;

À minha querida avó Iaia, que infelizmente não poderá participar da conclusão desse trabalho. É triste saber que não vou vê-la vibrando por mim, como sempre fazia. Você foi essencial para que tudo acontecesse. Agradeço também ao meu avô Nelson, quem plantou a semente da paixão pelos animais e pela vida no campo no meu coração;

Ao meu orientador, mestre, professor e amigo Dr. Romildo Romualdo Weiss, por compartilhar comigo sua sabedoria, ensinamentos e experiências profissionais. Todos esses anos de trabalho em conjunto desde a graduação, mestrado e agora no doutorado acarretaram em grande amadurecimento pessoal e profissional. Obrigado pelo exemplo, pelas conversas agradáveis sobre boi gordo, pela orientação técnica em reprodução animal. Poucos possuem a sua experiência e sinto-me privilegiada de poder compartilha-la. Palavras nunca serão suficientes para agradecer;

Ao colegiado do curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelo suporte ao longo desses seis anos de trabalho na área de biotecnologia e também às secretárias Celina e agora Gerusa, pelo apoio com as questões burocráticas.

Aos professores Vanete Thomaz Soccol, Carlos Ricardo Soccol, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Fabiano Montiani Ferreira, Rosangela Locatelli Dittrich, e todos os outros do departamento de Medicina Veterinária e de Tecnologia da UFPR

pelo apoio e orientações para que esse trabalho fosse executado da melhor forma possível;

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa, Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR), Vanete Thomaz Soccol (UFPR), Rudiger Daniel Ollhoff (PUCPR) e Marcelo Marcondes Seneda (UEL) por dedicarem o seu tempo para leitura e avaliação deste trabalho;

Aos colegas de profissão Ana Cláudia, Larissa, Aline Fujita, Renata, Tácia, pelo companheirismo durante as aulas e os experimentos, e também aos Médicos Veterinários residentes do hospital veterinário da UFPR;

Aos alunos do curso de graduação de Medicina Veterinária da UFPR, das turmas desses últimos seis anos, pela convivência nas aulas práticas e teóricas e nas viagens para as fazendas e haras. Especialmente aos monitores e alunos de iniciação científica em reprodução animal, pela interação acadêmica;

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, Dorly, Dito e Luís pela convivência diária, principalmente na fase de redação desse trabalho;

Aos colegas e aos técnicos dos laboratórios da UFPR, PUC/PR, e UNESP/Botucatu, pela fundamental cooperação durante o período experimental e por vibrarem junto comigo a cada resultado positivo;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CnPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos nível doutorado;

Aos funcionários da Fazenda Casa de Pedras, no Paraná que viabilizaram a execução da parte prática desse estudo, e aos animais que cooperaram após serem tratados com respeito;

A todas as pessoas não citadas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho,

MUITO OBRIGADO!

*"Todos os que desfrutam acreditam que na árvore o que importa é o fruto,
quando na verdade o que importa é a semente: eis a diferença entre os
que desfrutam e os que creem."*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Os objetivos desse estudo foram: comparar as dimensões do epidídimo, a biometria testicular e a viabilidade dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos, determinar a eficácia de dois diluentes comerciais na criopreservação e avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozoides do epidídimo, na produção *in vitro* de embriões (PIVE) e na inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Após orquiectomia de dez touros da raça Tabapuã, as dimensões e peso testiculares foram aferidos e os espermatozoides recuperados por fluxo retrógrado após permanecerem 6, 12, 18, 24 e 30 horas na cauda dos epidídimos (n=20) em $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade, vigor, concentração e morfologia, e os resultados comparados entre os obtidos dos epidídimos direitos e esquerdos. Para criopreservação utilizou-se dois diluentes comerciais: Botubov® (BB) e Bovimix® (BV). Os parâmetros espermáticos pós-descongelamento foram determinados no CASA (*computer-assisted sperm analysis*) e por análises microscópicas (integridade de membranas plasmáticas e acrossomal e morfologia). Doses de espermatozoides do epidídimo (G6, G12, G18, G24 e G30), e do ejaculado criopreservadas com o diluente BB, foram utilizadas na fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos obtidos em abatedouro. O cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões manteve-se por oito dias e a taxa de clivagem (dia três), a taxa de blastocistos (dia sete e oito) e a taxa de eclosão (dia oito) foram determinadas para cada grupo. O número total de células embrionárias foi definido. Dez doses criopreservadas do grupo que permaneceu mais tempo na cauda do epidídimo após orquiectomia (G30) foram utilizadas na inseminação artificial em tempo fixo de dez novilhas da raça Tabapuã. Os softwares JMP v.15 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e o Statgraphics® Centurion XVI foram utilizados para estatística. Utilizou-se nível de significância ($p < 0,05$). Os resultados obtidos foram: a biometria dos testículos e epidídimos direito e esquerdo, bem como os parâmetros dos espermatozoides (motilidade, vigor, concentração e morfologia) são iguais em touros zebuínos. Os dois diluentes comerciais utilizados para criopreservação de sêmen convencional (BB e BV) são eficazes para espermatozoides do epidídimo, não apresentando diferença entre si nos parâmetros estudados ($p > 0,05$). Em todos os grupos foi possível produzir embriões viáveis *in vitro*. O número de blastocistos, e a taxa de eclosão são menores conforme aumenta o tempo de exposição à temperatura ambiente dos espermatozoides na cauda do epidídimo. Quando testados *in vivo*, os espermatozoides do G30, com apenas 5,2% de motilidade progressiva, estavam aptos a fecundar, obtendo-se o resultado satisfatório de uma prenhez. Conclui-se que, os dois testículos e epidídimos são semelhantes em morfologia e características espermáticas, BB e BV podem ser utilizados na criopreservação de espermatozoides do epidídimo e é possível produzir embriões *in vitro* até o estágio de blastocisto eclodido e uma gestação após IATF a partir de espermatozoides bovinos criopreservados quando recuperados da cauda de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18 à 20°C, até 30 horas pós-orquiectomia.

Palavras-chave: espermatozoides, epidídimo, criopreservação, FIV, IATF

ABSTRACT

The aims of this study were: to compare the epididymis dimensions, testis size and viability of recovered spermatozoa from right and left epididymis of Zebu bulls, to determine the efficacy of two commercial extenders in cryopreservation and assess the fertilizing capacity on *in vitro* embryo production and fixed time artificial insemination (FTAI) of sperm from the epididymis. After orchiectomy of ten Tabapuã bulls, the dimensions and testicular weight were measured. The sperm were recovered by retrograde flow after remaining for 6, 12, 18, 24 and 30 hours at room temperature ($19 \pm 1^\circ\text{C}$) on the epididymal tail ($n=20$). The following sperm parameters were evaluated: motility, vigor, concentration and morphology, and the results compared between right and left testicle. For cryopreservation, two commercial extenders were used: Botubov[®] (BB) and Bovimix[®] (BV). The post-thaw sperm parameters were determined with CASA (computer-assisted sperm analysis) and microscopic analyzes for assessing the integrity of cell and acrosomal membranes, and sperm morphology. Cryopreserved doses (G6, G12, G18, G24 e G30) with BB diluent, from the epididymis and electroejaculation of the same bulls, have been used *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes obtained from a slaughterhouse. After fertilization, the *in vitro* culture (IVC) of the embryos was maintained for eight days. The cleavage rate (day three), blastocyst rate (day seven and eight) and hatching rate (day eight) were determined for each group. The total number of cells of embryos has been set. Ten doses of cryopreserved sperm from the group that remained more time in the epididymal tail after orchiectomy (G30) were used in fixed time artificial insemination of ten Tabapuã heifers. The software JMP v.15 and the Statgraphics[®] Centurion XVI were used for statistical analysis. For all analyzes, significance level was ($P<0.05$). The results were: biometrics of the testis and epididymis and the sperm parameters (motility, vigor, concentration and morphology) do not differ between the right and left testicle in Zebu bulls. The two commercial diluents (BB and BV) for cryopreservation of conventional semen are effective for epididymal sperm, with no difference in the studied parameters ($P>0.05$). In all groups it was possible to produce viable embryos *in vitro*. The number of blastocyst and hatching rates are lower with increasing time of exposure of the spermatozoa to room temperature. When tested *in vivo*, the sperm of G30, with only 5.2% of progressive motility, were able to fertilize, resulting in one successful pregnancy. In conclusion both testicles and epididymides are similar in morphology and sperm characteristics, BB and BV may be used for cryopreservation of epididymal bull sperm and it is possible to produce embryos (blastocyst) *in vitro* and a pregnancy after FTAI from cryopreserved bull spermatozoa after recovery from the tail of epididymis kept at room temperature of 18 to 20°C until 30 hours.

Keywords: spermatozoa, epididymis, cryopreservation, IVF, FTAI

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1- DUCTO EPIDIDIMÁRIO ENOVELADO APÓS DISSECAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOURO.....26
- FIGURA 2 – GOTA CITOPLASMÁTICA MEDIAL NA CAUDA DO ESPERMATOZOIDE DO EPIDÍDIMO DE TOURO, EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (400X).....29
- FIGURA 3- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODO DE MIGRAÇÃO DA GOTA CITOPLASMÁTICA AO LONGO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA DO ESPERMATOZOIDE.....30
- FIGURA 4 – QUATRO CATEGORIAS DE COMPLEXO CÚMULUS-OÓCITOS (COCS) DE BOVINOS, DETERMINADAS DE ACORDO COM A APARÊNCIA MORFOLÓGICA DO CITOPLASMA E DAS CÉLULAS DO CUMULUS. CATEGORIA 1 – OÓCITO COM CITOPLASMA HOMOGÊNIO E MULTICAMADAS COMPLETAS DE CÉLULAS DO CUMULUS; CATEGORIA 2- MULTICAMADAS (MAIS DE CINCO) DE CÉLULAS DO CUMULUS MENORES QUE NA CATEGORIA 1; CATEGORIA 3 – OÓCITO COM CITOPLASMA HETEROGÊNIO E TRÊS A CINCO CAMADAS DE CÉLULAS DO CUMULUS COMPLETAS OU NÃO; CATEGORIA 4 – OÓCITO COM CITOPLASMA HETEROGÊNIO E AUSÊNCIA DE CÉLULAS DO CUMULUS.....39
- FIGURA 5- PLACAS DE PETRI CONTENDO SETE GOTAS COM 30 OÓCITOS CADA, APÓS MATURAÇÃO IN VITRO. NESSE MOMENTO OS OÓCITOS SERÃO FERTILIZADOS COM OS ESPERMATOZOIDES SELECIONADOS.....42
- FIGURA 6 – IMAGEM OBTIDA EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE EMBRIÕES BOVINOS (BLASTOCISTOS) PRODUZIDOS IN VITRO COM SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO.....43
- FIGURA 7 – IMAGEM OBTIDA EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE EMBRIÕES BOVINOS (BLASTOCISTO ECLODIDO, EM DESTAQUE) PRODUZIDOS IN VITRO COM OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO.....44

CAPÍTULO II – ARTIGO 1

FIGURA 1 – A1 -TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO ESQUERDO; B1 - TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO DIREITO; A2 – EPIDÍDIMO ESQUERDO; B2 – EPIDÍDIMO DIREITO, DE TOUROS ZEBUÍNOS.....60

FIGURA 2- GRÁFICO DA FUNÇÃO OBTIDA APÓS PLOTAGEM DOS DADOS DO PESO TESTICULAR, E DA CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES POR ML OBTIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO APÓS ORQUIECTOMIA DE TOUROS ZEBUÍNOS.66

CAPÍTULO III – ARTIGO 2

FIGURA 1- FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES.78

CAPÍTULO IX – ARTIGO 3

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO HORMONAL UTILIZADO PARA SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM NOVILHAS TABAPUÃ (BOS TAURUS INDICUS). BE, BENZOATO DE ESTRADIOL (BIOESTROGEN, BIOGENESIS BAGÓ); PGF, PROSTAGLANDINA F2ALFA (CRONIBEM, BIOGENESIS BAGÓ); CE, CIPIONATO DE ESTRADIOL (CRONI-CIP, BIOGENESIS BAGÓ), P4, IMPLANTE INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (CRONIPRESS MONODOSE, BIOGENESIS BAGÓ), ECG, GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (NOVORMON, SYNTAX, ARGENTINA), NO DIA 0 (D0), DIA 8 (D8) E NO DIA 10 (D10).....98

FIGURA 2 – A: OVÁRIO BOVINO OBTIDO EM ABATEDOURO; B: ASPIRAÇÃO MANUAL DE FOLÍCULOS ANTRAIS ENTRE 3 E 8 MM DE DIÂMETRO; C: LIQUIDO FOLICULAR CONTENDO OÓCITOS, DEPOSITADO EM PLACA DE PETRI ESTÉRIL..... 99

FIGURA 3 – IMAGEM EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE OÓCITOS BOVINOS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR, COM COMPLEXO CUMULUS-OÓCITOS (COC) EM DESTAQUE.....100

FIGURA 4- FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA O TESTE DE FERTILIDADE. OS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DO EPIDÍDIMO FORAM UTILIZADOS PARA FERTILIZAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS OBTIDOS EM ABATEDOUROS E NA INSEMINAÇÃO

	ARTIFICIAL	EM	TEMPO	FIXO	DE	
	NOVILHAS.....					104
FIGURA 5 -	IMAGEM EM ESTEROMICROSCÓPIO (120X) DOS EMBRIÕES BOVINOS EM VÁRIOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM D7 DO CULTIVO IN VITRO A PARTIR DO DIA DA FECUNDAÇÃO IN VITRO COM ESPERMATOZOIDES MANTIDOS 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) E 30 HORAS (G30) NA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOUROS (BOS TAURUS INDICUS) EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C).....					109
FIGURA 6-	FOTOMICROGRAFIA DE EPIFLUORESCÊNCIA (400X), COLORAÇÃO DIFERENCIAL (DAPI) DE DOIS BLASTOCISTOS BOVINOS ECLODIDOS EM D8, FERTILIZADOS IN VITRO POR ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO 6 (G6EP) E 12 HORAS (G12EP) EM 18-20°C APÓS ORQUIECTOMIA DE TOUROS ZEBUÍNOS (<i>BOS TAURUS INDICUS</i>). OBSERVA-SE A IMAGEM DA ESQUERDA UM EMBRIÃO COM MAIOR NÚMERO DE CÉLULAS (280,5); E NA DIREITA UM EMBRIÃO COM MENOR NÚMERO DE CÉLULAS (191,7).....					111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – ARTIGO 1

- TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DIREITO E ESQUERDO DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*).....63
- TABELA 2- COMPARAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DIREITO E ESQUERDO DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*).....64

CAPÍTULO III – ARTIGO 2

- TABELA 1 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DILUENTES COMERCIAIS BOTU-BOV® E BOVIMIX® PARA OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO): MT (%); MP (%); VAP (MMS^{-1}); VSL (MM S^{-1}); VCL (MM S^{-1}); ALH (MM); BCF (HZ); STR (%); LIN (%) E RAP (%) DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS PÓS-DESCONGELAÇÃO.....82
- TABELA 2 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DILUENTES COMERCIAIS BOTU-BOV® E BOVIMIX® (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) PARA A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA, DEFEITOS DE ACROSSOMA E INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS.....84

CAPÍTULO IX – ARTIGO 3

- TABELA 1- MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DOS DADOS OBTIDOS POR *COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS* (CASA) E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZOIDES PÓS-DESCONGELAMENTO, COLHIDOS POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-ORQUIECTOMIA (6, 12, 18, 24 E 30 HORAS).....105
- TABELA 2- NÚMERO TOTAL DE OÓCITOS (N), MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DA TAXA DE CLIVAGEM (DIA 3), DE BLASTOCISTO (DIA 7) E DE BLASTOCISTO ACUMULADA (DIA 8), DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES COM SÊMEN CRIOPRESERVADO COLHIDO POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-ORQUIECTOMIA (G6, G12, G18, G24, G30).....107

TABELA 3 - TAXA DE ECLOSÃO EMBRIONÁRIA (D8) E CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS (CTC) DE EMBRIÕES ECLODIDOS (N) EM D8, PRODUZIDOS *IN VITRO* UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO COLHIDO POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES PERÍODOS PÓS-ORQUIECTOMIA (G6, G12, G18, G24, G30).....110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

@ - arroba

® - marca registrada

µL – microlitros

BE – Benzoato de estradiol

BSA – Albulmina sérica bovina

CASA - *Computer assisted sperm analysis*

CIV – Cultivo *in vitro*

cm - centímetros

COCs – Complexos *cumulus-oophorus*

CTC – Contagem total de células

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

ECP – Cipionato de estradiol

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio folículo- estimulante

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

LH – Hormônio luteinizante

mg – miligrama

MIV - maturação *in vitro*

mL – mililitros

mm – milímetros

mM - milimolar

N₂ – Nitrogênio líquido

P4 – Progesterona

PGF – Prostaglandina

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

SFB – Soro fetal bovino

X g- Força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. HIPÓTESE.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Geral	23
4.2 Específicos.....	23
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
5.1 Epidídimo	25
5.2 Recuperação de espermatozoides do epidídimo	28
5.3 Criopreservação de espermatozoides do epidídimo	32
5.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	37
5.4.1 Colheita dos oócitos.....	37
5.4.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	40
5.4.3 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	41
5.4.4 Cultivo (CIV) e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	42
6. REFERÊNCIAS.....	47
CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DIREITOS E ESQUERDOS DE TOUROS ZEBUÍNOS.	54
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4. CONCLUSÃO.....	67
5. AGRADECIMENTO.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68
DOIS DILUENTES COMERCIAIS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS	71
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80

4. CONCLUSÃO	85
5. REFERENCIAS	86
POTENCIAL DE FERTILIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE ESPERMATOZOIDES	
BOVINOS CRIOPRESERVADOS DO EPIDÍDIMO ATÉ 30 HORAS A 18-20°C.....	86
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 Seleção dos animais e amostras do ejaculado (EJ).....	93
2.2 Obtenção dos testículos e dos espermatozoides do epidídimo (EP)	94
2.3 Criopreservação	95
2.4 Avaliação espermática	96
2.5 Fertilização <i>in vivo</i>	96
2.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	98
2.6.1 Colheita e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	99
2.6.2 Seleção espermática e fertilização <i>in vitro</i>	101
2.6.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) e avaliação dos embriões.....	102
2.7 Análise estatística	104
3. RESULTADOS	105
4. DISCUSSÃO	112
5. CONCLUSÃO.....	122
6. REFERÊNCIAS	124
7. ANEXOS.....	130

1. INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 213,4 milhões de cabeças de gado, o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo. São mais bovinos que habitantes no país o que demonstra grande potencial do setor agropecuário na economia nacional. Cerca de 80% do rebanho é composto por animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), de comprovada rusticidade e adaptação ao ambiente predominante no Brasil (DBO, 2016). Com o contínuo crescimento da atividade pecuária, é necessário produzir mais em menor área, através da aplicação de tecnologias no campo e investimento em melhoramento genético animal que potencializam a rentabilidade.

Na produção de bovinos, a recuperação de espermatozoides diretamente do epidídimo é uma alternativa viável em programas de reprodução assistida, quando ocorre morte inesperada do reprodutor, doenças ou em casos de touros incapazes de ejacular por algum motivo (BARKER, 1954). A quantidade de espermatozoides que constituem a reserva espermática no touro em repouso sexual é em torno de 73×10^9 , e 54% estão armazenados na cauda do epidídimo. Por esse motivo a cauda do epidídimo é o local escolhido para obtenção dos gametas. A reserva disponível é alterada pela quantidade e frequência de ejaculações (AMANN e ALMQUIST, 1962), quanto maior a frequência de ejaculações, menor a concentração de espermatozoides disponíveis.

Obter espermatozoides do epidídimo é útil e recomendado para animais puros de origem (P.O.) que possuem valor diferenciado no mercado e são responsáveis pela manutenção e propagação de genes melhoradores. Enquanto o @ do boi gordo em janeiro de 2016 estava valendo R\$154,00 (SCOT CONSULTORIA, 2016), um animal

com 600 kg de peso vivo, e 54% de rendimento, rende R\$ 3.326,40 em carne quando abatido. Já um reprodutor de elite (P.O) tem valor inicial de R\$ 6.000,00 chegando até R\$ 1.000.000,00 ou mais (PONTES, 2011). Se um animal com esse valor morre repentinamente, a reserva no epidídimo se torna fonte adicional de gametas, mesmo se o reprodutor for um doador frequente de sêmen.

A criopreservação permite o armazenamento, em longo prazo, dos gametas facilitando o transporte do sêmen por longas distâncias e prorrogando a utilização de material genético de animais importantes, além de preservar a biodiversidade de espécies ameaçadas de extinção (BAILEY et al., 2000). Essa prática é descrita por alguns autores para espermatozoides recuperados do epidídimo de touros (MARTINS et al., 2007; COSTA et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; BERTOL et al., 2014; LOPES et al., 2015), e os diluentes a base de TRIS-gema de ovo expressam os melhores resultados dos parâmetros de viabilidade pós-descongelamento. Entretanto, ainda não foram estabelecidos o melhor diluente e protocolo para manutenção da maior parte das células viáveis.

O método com maior precisão na avaliação da viabilidade pós-descongelamento é a análise computadorizada do sêmen (CASA), que captura uma sequência de imagens do trajeto dos espermatozoides e permite a análise de vários parâmetros de forma objetiva, incluindo a concentração, morfologia e padrões de movimento, eliminando a subjetividade (VERSTEGEN et al., 2002). Posteriormente à análise computadorizada, o potencial de fertilização é o teste final para comprovar a eficiência da célula espermática em fecundar o oócito. Pode ser determinado em laboratório, através da fertilização *in vitro* (FIV), e *in vivo*, por meio da inseminação artificial. Em bovinos, espermatozoides criopreservados do epidídimo já foram utilizados com

sucesso na inseminação artificial convencional de vacas (COSTA et al., 2011) e na produção *in vitro* de embriões (MARTINS et al., 2009), comprovando sua fertilidade. Nesses dois casos, os epidídimos foram mantidos refrigerados (5°C) anteriormente a colheita dos gametas. A manutenção em temperatura baixa desacelera a degradação tecidual causada pela interrupção do fluxo sanguíneo e oxigenação dos tecidos, prorrogando a viabilidade espermática.

As alterações *post-mortem* ocorrem mais lentamente no epidídimo do que no testículo. Estudos demonstram que com seis horas após a morte, as células do epitélio epididimário permanecem inalteradas, e somente após 18 horas, as alterações degenerativas tornam-se aparentes. Em 24 horas a estrutura do ducto epididimário é afetada com influência direta na viabilidade dos espermatozoides recuperados (SONGSASEN et al., 1998). Quanto maior a temperatura, mais rápido essas modificações estruturais ocorrem.

Nesse contexto, nossa equipe de pesquisa trabalha desde 2010 com a recuperação de espermatozoides bovinos de epidídimo mantidos exclusivamente em temperatura ambiente. Nos primeiros estudos desenvolvidos, o objetivo foi determinar em quanto tempo após a morte era possível recuperar espermatozoides do epidídimo na temperatura de 18 a 20°C. Após o teste de diferentes tempos de armazenamento, conclui-se que é possível recuperar espermatozoides após permanecerem por 30 horas na cauda do epidídimo de touros, com 41,25% de motilidade total. Características peculiares aos espermatozoides do epidídimo foram definidas, como concentração total e particularidades morfológicas (BERTOL, 2012). Além disso, foi demonstrado que é possível preservar temporariamente em temperatura de refrigeração (5°C), os

espermatozoides após recuperação, por um período de 15 a 36 horas (BERTOL et al., 2013).

Outras questões que surgiram durante as pesquisas foram: em casos de comprometimento unilateral, o outro testículo e epidídimo persistem com produção semelhante, ou há diferença na formação espermática e biometria testicular esquerda e direita. Para isso foi desenvolvido um estudo comparativo. Em seguida, com a necessidade de aproveitamento dos espermatozoides do epidídimo em maior tempo após a recuperação, fez-se necessário testar a possibilidade de criopreservação, comparando-se dois diluentes para identificar qual teria o melhor desempenho na preservação da viabilidade pós-descongelamento da maior parte dos espermatozoides do epidídimo. Uma vez determinada a técnica de criopreservação, o próximo passo seria verificar o potencial de fecundação *in vitro* e como teste final de fertilidade, a inseminação artificial.

Deste modo, para desenvolver tais questões o presente trabalho dá continuidade aos estudos com a biometria testicular e epididimária, e características dos espermatozoides recuperados dos epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos (*Bos taurus indicus*) (CAPÍTULO II), criopreservação e teste de diluentes (CAPÍTULO III), e capacidade fecundante através da produção *in vitro* de embriões, e *in vivo* por inseminação artificial em tempo fixo com espermatozoides do epidídimo mantidos em temperatura ambiente (CAPÍTULO IV).

2. HIPÓTESE

Os dois testículos e epidídimos do touro possuem dimensões e peso equivalentes, produzem e armazenam espermatozoides com características iguais. Espermatozoides recuperados de epidídimos podem ser criopreservados com diluentes de sêmen convencional existentes no mercado. Ao utilizar espermatozoides de epidídimos mantidos em temperatura ambiente por até 30 horas pós-orquiectomia de touros nas biotecnologias de produção *in vitro* de embriões e inseminação artificial em tempo fixo é possível obter embriões viáveis.

3. JUSTIFICATIVA

Diante da importância econômica que a atividade pecuária possui no Brasil, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que possam ser aplicadas no campo de forma prática e eficiente, melhorando o rendimento do setor e acelerando o ganho genético dos animais. Nesse contexto, a recuperação, criopreservação e posterior utilização em reprodução assistida de espermatozoides do epidídimo de reprodutores de alto valor genético, como a produção *in vitro* de embriões e a inseminação artificial em tempo fixo, destacam-se como biotecnologias imprescindíveis.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar o potencial de criopreservação e fertilização *in vitro* e *in vivo* de espermatozoides recuperados de epidídimos mantidos exclusivamente em temperatura ambiente (18-20°C).

4.2 Específicos

- Comparar as características biométricas e os parâmetros de viabilidade de espermatozoides de epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos;
- Demonstrar a possibilidade de criopreservação e comparar o desempenho de dois diluentes comerciais utilizados para sêmen convencional no congelamento de espermatozoides do epidídimo;
- Determinar quais fatores tem influência na viabilidade espermática pós-descongelamento de espermatozoides do epidídimo;
- Avaliar o potencial de fertilização de oócitos *in vitro* com espermatozoides criopreservados após recuperação de epidídimos mantidos até 30 horas, em temperatura ambiente (18-20°C) pós-orquiectomia de bovinos;
- Determinar a taxa de clivagem (D3), a taxa de blastocisto (D7 e D8) e a taxa de eclosão (D8) de oócitos fecundados com espermatozoides do epidídimo 6, 12,

18, 24 e 30 horas após orquiectomia e com espermatozoides colhidos por eletroejaculação dos mesmos touros;

- Caracterizar a qualidade embrionária através da técnica de contagem do número total de células dos embriões eclodidos em D8;
- Verificar a taxa de prenhez de novilhas zebuínas sincronizadas para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com espermatozoides criopreservados do grupo que permaneceu maior tempo na cauda do epidídimo (30 horas), após orquiectomia de touros zebuínos.

CAPÍTULO I**5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA****5.1 Epidídimo**

O epidídimo é um órgão do aparelho genital masculino composto por um ducto único, longo e enovelado de aproximadamente 36 metros de comprimento no touro (HAFEZ e HAFEZ, 2004) que fornece condições necessárias para a maturação, desenvolvimento da motilidade, concentração e armazenamento dos espermatozoides antes da ejaculação. Durante a passagem pelo epidídimo, os gametas adquirem capacidade fecundante, obtêm motilidade progressiva, sofrem alterações no equilíbrio ácido-básico e na membrana plasmática, além de alterações morfológicas como a migração da gota citoplasmática da região proximal para a região distal da cauda (GONÇALVES et al., 2008).

O epidídimo é revestido internamente por vários tipos de células epiteliais, localizadas ao longo de todo o ducto (células principais) ou em regiões específicas. Sua principal função é a secreção de substâncias reguladoras da maturação dos espermatozoides e de fatores inibidores da motilidade (ROBAIRE et al., 2006). É necessário que os espermatozoides sejam mantidos imóveis no interior do epidídimo, para otimizar o processo de maturação e reduzir o gasto energético celular.

Anatomicamente o órgão é dividido em três porções principais: a cabeça o corpo e a cauda. A cauda do epidídimo armazena até o momento da ejaculação, aproximadamente 25 a 70% dos espermatozoides produzidos diariamente (GONÇALVES et al., 2008). É formada pelo ducto epididimário enovelado (FIGURA 1) e

termina na porção proximal do ducto deferente. No lúmen, os espermatozoides ficam armazenados em camadas, até o momento do reflexo ejaculatório e estímulo para a emissão do sêmen.

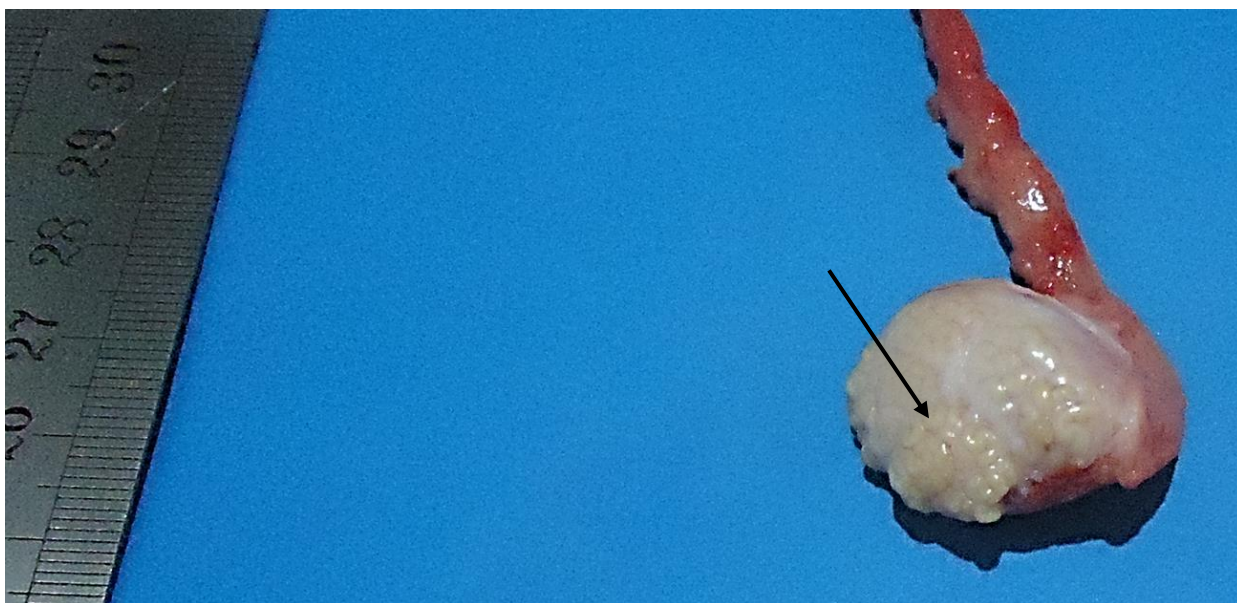


FIGURA 1- DUCTO EPIDIDIMÁRIO ENOVELADO APÓS DISSECAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOURO.

FONTE: O AUTOR (2015).

A habilidade da cauda do epidídimo em armazenar os espermatozoides se deve a uma combinação de fatores bioquímicos, a atuação de andrógenos e a baixa temperatura nessa região anatômica. No lúmen do epidídimo os espermatozoides entram em contato com fatores inibitórios de motilidade, e são mantidos imóveis no interior do trato reprodutivo até o estímulo para sua liberação, quando os inibidores da motilidade são eliminados pela presença de outras secreções de glândulas anexas, que se misturam aos gametas para formação do ejaculado (SKANDHAN, 2004). O sêmen é

composto pelos espermatozoides mais a secreção das glândulas anexas (plasma seminal).

A temperatura reduzida no testículo e epidídimo (aproximadamente 3 graus abaixo da temperatura corporal) é essencial para o processo de formação e maturação das células espermáticas. Ross e Entwistle (1979) avaliaram o efeito da elevação da temperatura escrotal na morfologia dos espermatozoides, na espermatogênese e no trânsito pelo epidídimo. Com o aquecimento escrotal houve alteração na qualidade do sêmen com redução na porcentagem de espermatozoides vivos e móveis, elevação dos morfologicamente anormais, e redução na concentração por mL.

Por possuir capacidade de preservar gametas viáveis por períodos que excedam 30 dias, a cauda do epidídimo é considerada o principal local de armazenamento de espermatozoides no trato genital de mamíferos. O tempo de trânsito normal dos gametas através da cauda do epidídimo é de três a 10 dias. A capacidade de reserva é variável. Touros em repouso sexual (sete ou mais dias sem ejaculação) possuem três a cinco vezes mais espermatozoides disponíveis para a ejaculação do que a produção diária normal. Além disso, a concentração total no ejaculado é de duas a três vezes maior do que o normal. Quando ocorre ejaculação frequente, (a cada dois dias) a quantidade de espermatozoides na cauda do epidídimo diminui consideravelmente resultando em baixa concentração final no ejaculado (ROBAIRE et al., 2006).

5.2 Recuperação de espermatozoides do epidídimo

A técnica de obtenção de gametas diretamente do epidídimo tem como principal objetivo a preservação de material genético importante em condições adversas (KAABI et al., 2003). A recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo após a morte ou após orquiectomia é descrita em diferentes espécies de animais domésticos e selvagens, como caninos (MARTINS et al., 2012) e felinos (COCCHIA et al., 2010; GAÑÁN et al., 2009; THUWANUT et al., 2010), ovinos (KAABI et al., 2003; EHLING et al., 2006; LONE et al., 2011; TAMAYO-CANUL et al., 2011; ÁLVAREZ et al., 2012), bovinos (MARTINS et al., 2007, 2009; BERTOL, 2012; TURRI et al., 2012; BERTOL et al., 2013), búfalos (HEROLD et al., 2006), equinos (BRUEMMER, 2006; MURADÁS et al., 2006; WEISS et al., 2008; HEISE et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011), suínos (KIKUCHI et al., 1999) e cervídeos selvagens (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2007).

Outra indicação da técnica é quando há impossibilidade de obter os espermatozoides através de métodos convencionais de colheita de sêmen por falta de condicionamento dos animais. Em estudo em que os machos seriam destinados ao abate, preferiu-se recuperar os espermatozoides diretamente do epidídimo após a orquiectomia de carneiros ao invés do método convencional por vagina artificial, uma vez que não é necessário condicionar previamente os reprodutores (EHLING et al., 2006).

Por se tratar de um local de armazenamento de gametas, a concentração de espermatozoides na cauda do epidídimo é alta, e significativamente superior à

concentração do sêmen após ejaculação (BERTOL, 2012). Além da maior concentração, os espermatozoides do epidídimo possuem outras particularidades, como a alta frequência de gotas citoplasmáticas na região medial e distal da cauda (BARTH e OKO, 1989; EHLING et al., 2006; MARTINS et al., 2007, 2009; BERTOL et al., 2014). A gota citoplasmática é uma pequena massa esférica de 2-3 μm de diâmetro (FIGURA 2), encontrada em baixa quantidade nos espermatozoides do ejaculado, pois é liberada durante a ejaculação.



FIGURA 2. GOTA CITOPLASMÁTICA MEDIAL NA CAUDA DO ESPERMATOZOIDE DO EPIDÍDIMO DE TOURO, EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (400X).

FONTE: BERTOL (2012).

Durante o trânsito pelo epidídimo, a gota citoplasmática se desloca da região proximal da cauda, na base do colo, até a região medial e distal (FIGURA 3). Ainda não está totalmente esclarecido de que forma ocorre esse deslocamento, mas uma hipótese é de que o efluxo e influxo de água na célula espermática, durante a regulação

isovolumétrica, ocasiona o deslocamento caudal da gota ao longo da peça intermediária (COOPER et al., 2011).

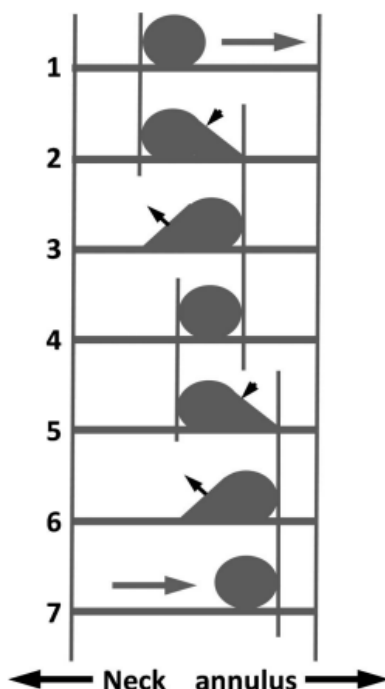


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODO DE MIGRAÇÃO DA GOTA CITOPLASMÁTICA AO LONGO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA DO ESPERMATOZOIDE.

FONTE: COOPER et al. (2011)

A presença de gotas citoplasmáticas distais, não é considerada alteração grave, pois não interfere na capacidade fecundante do espermatozoide. Grande parte das gotas é liberada após incubação em banho-maria por 15 a 30 minutos ou após agitação dos espermatozoides (BARTH e OKO, 1989). Para os espermatozoides recuperados diretamente do epidídimo, a presença das gotas citoplasmáticas não é considerada anormal, e sim, fisiológica (EHLING et al., 2006).

Os espermatozoides do epidídimo não possuem plasma seminal, pela ausência do reflexo ejaculatório. Na avaliação da influência do plasma seminal na qualidade dos gametas do epidídimo de garanhão, fresco e pós-descongelamento, a secreção das glândulas anexas parece ter influência positiva na morfologia dos espermatozoides anormais, e os autores sugerem a lavagem da cauda do epidídimo com plasma seminal (HEISE et al., 2011). Em relação à motilidade, os espermatozoides do epidídimo não diferem do ejaculado, quando recuperados nas primeiras horas após a morte ou após a orquiectomia dos reprodutores (MURADÁS et al., 2006; WEISS et al., 2008; MONTEIRO et al. 2011; BERTOL et al., 2013).

Na espécie bovina, há estudos com espermatozoides do epidídimo manipulados em diferentes condições (MARTINS et al., 2007, 2009; BERTOL, 2012; BERTOL et al., 2013; BARBOSA et al., 2014). Na maioria, os espermatozoides foram recuperados após os testículos e epidídimos serem mantidos em refrigeração (5°C), o que retarda o processo de degeneração celular, aumentando o tempo de viabilidade dos gametas (YU e LEIBO, 2002).

Na comparação de manutenção dos epidídimos em temperatura ambiente (17,9 à 21,5°C) com temperatura de refrigeração (4,9 à 6°C) em ovinos, o efeito prejudicial da maior temperatura na integridade de acrossoma, motilidade, concentração e morfologia espermática foi significativo. Se possível os epidídimos e testículos devem ser transportados refrigerados até o laboratório, para aumentar o tempo hábil de processamento (LONE et al., 2011).

A manutenção dos epidídimos refrigerados possibilita a obtenção de espermatozoides viáveis por até 72 horas após a morte de touros (Martins et al., 2009).

Por outro lado, torna-se importante testar também a temperatura ambiente, para determinar a janela de oportunidade de manipulação dos gametas quando o animal é encontrado morto no campo exposto às condições climáticas por algumas horas. Em temperatura ambiente, é possível recuperar gametas viáveis, com 41,25% de motilidade progressiva, por até 30 horas após a orquiectomia. Além disso, após diluição em meio sem crioprotetor posteriormente à colheita, os espermatozoides podem ser mantidos por algumas horas (15 a 40) em refrigeração, sendo a resistência a 5°C inversamente proporcional ao tempo de permanência no epidídimo (BERTOL et al., 2013).

Quanto maior o tempo de permanência dos gametas na cauda do epidídimo após a morte ou após a orquiectomia, maiores os danos à célula espermática. Em temperatura ambiente, a motilidade é o primeiro parâmetro afetado. Quanto maior o tempo, maior a queda da porcentagem de espermatozoides móveis, agravando-se a partir de 24 horas (WEISS et al., 2008; BERTOL et al., 2013).

5.3 Criopreservação de espermatozoides do epidídimo

A criopreservação é considerada a forma mais eficaz de preservação em longo prazo de material genético, células, tecidos e microrganismos, pois é capaz de manter material biológico em temperaturas muito baixas, por tempo indeterminado. Os métodos de conservação de sêmen na forma líquida permitem a manutenção por apenas alguns dias, enquanto na forma congelada em nitrogênio líquido, é possível o armazenamento durante anos, sem diminuição significativa na qualidade dos espermatozoides (FAO, 2013).

A descoberta da preservação em baixas temperaturas do sêmen de bovinos permitiu o aumento na utilização da biotecnologia da inseminação artificial nessa espécie. Espermatozoides do epidídimo foram congelados pela primeira vez em 26 de novembro de 1953, após o abate de um touro Jersey com idade de nove anos (BARKER, 1954). Por outro lado, o processo de criopreservação é prejudicial aos espermatozoides, pois há redução na fertilidade. Isso é em grande parte atribuído à alteração na estrutura e função da membrana plasmática durante o congelamento e descongelamento, pela formação dos cristais de gelo (PARKS e GRAHAM, 1992). Da mesma forma que ocorre com sêmen convencional, os espermatozoides do epidídimo pós-descongelamento manifestam redução significativa na motilidade, no vigor e na integridade de membrana plasmática, em relação ao fresco (BARBOSA et al., 2014).

Recentemente, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de caracterizar os melhores protocolos e meios diluidores para a criopreservação espermatozoides do epidídimo de touros. Barbosa et al. (2014) utilizaram protocolo já conhecido para criopreservação de sêmen convencional, em caixas de poliestireno e diluição com meio a base de gema de ovo, o Botubov[®] (Botupharma, Botucatu, São Paulo), para criopreservar espermatozoides oriundos do epidídimo. Os resultados de viabilidade espermática pós-descongelamento (motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática, integridade de DNA, atividade mitocondrial, integridade e funcionalidade da membrana), foram satisfatórios e semelhantes aos descritos para sêmen convencional nessa espécie. Nesse caso a recuperação dos gametas foi realizada imediatamente após o abate dos animais e o transporte até o laboratório feito em caixas térmicas.

Turri et al. (2012), compararam diferentes formas de colheita de espermatozoides do epidídimo de touros de raça europeia, e diferentes composições de diluentes com base de TRIS-gema de ovo para criopreservação dos gametas. Os espermatozoides foram recuperados no máximo 40 minutos após o abate e transportados em temperatura ambiente até o laboratório. Os resultados obtidos pós-descongelamento demonstraram ser viável a criopreservação nessas condições e que, o uso de meios com adição de gema de ovo no momento inicial de extração dos gametas, já é benéfico. Diluentes a base de TRIS-gema de ovo, desenvolvidos para criopreservação de sêmen de cão, também são uma alternativa viável para congelamento de sêmen do epidídimo de touros (LOPES et al., 2015).

Outra possibilidade é utilizar diluentes comerciais já existentes no mercado para criopreservação de sêmen convencional de touro. Na comparação de dois diluentes comerciais à base de TRIS-gema de ovo (Botu-bov® e Bovimix®) no congelamento de espermatozoides obtidos do epidídimo, não foi observada diferença nos resultados pós-descongelamento do movimento espermático (CASA), morfologia espermática e integridade de membranas plasmáticas e acrossomal entre os dois (BERTOL et al., 2014). O diluente Bovimix® também pode ser utilizado no congelamento de espermatozoides do epidídimo de cães, caracterizando uma alternativa viável nessa espécie (MARTINS et al., 2012).

Nesse mesmo contexto, Herold et al. (2006) compararam os diluentes Triladyl™ e AndroMed® (Minitub, Alemanha) na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de búfalos africanos selvagens (*Syncerus caffer*). Após os testes de viabilidade concluíram que o Triladyl™ é superior ao AndroMed®, na maioria dos parâmetros avaliados pós-descongelamento.

Quatro diluentes com diferentes concentrações e constituições foram testados para verificar possível especificidade para a criopreservação de espermatozoides ovinos recuperados de três origens (vagina artificial, eletroejaculação ou epidídimo), dos mesmos animais. Os resultados de viabilidade pós-descongelamento e de fertilidade após inseminação artificial, comprovam que o diluente com 20% de gema de ovo e 8% de glicerol e base de TES-Tris–frutose (TTF) foi significativamente mais eficaz na manutenção da viabilidade de espermatozoides obtidos do epidídimo nessa espécie (ÁLVAREZ et al., 2012).

Diluente a base de gema de ovo com 4% de glicerol foi utilizado para criopreservação de espermatozoides do epidídimo de felinos domésticos e selvagens —tigres de bengala (*Panthera tigris*)— com sucesso, proporcionando a aplicação dessa tecnologia em bancos de recursos genéticos de espécies de felinos selvagens (COCCHIA et al., 2009). Também com o objetivo de manutenção da diversidade genética de carneiros resistentes à paraplexia enzoótica dos ovinos (Scrapie), Ehling et al. (2006) utilizaram a criopreservação de gametas obtidos do epidídimo de 109 carneiros de diferentes raças. Nessa espécie, os espermatozoides do epidídimo foram mais resistentes aos estresses causados pelo congelamento (variações osmóticas, toxicidade de crioprotetores e variação de temperatura) quando comparados aos do ejaculado (VARISLI et al., 2009).

A concentração de açúcares e a escolha do carboidrato adicionado ao meio também interferem na qualidade pós-descongelamento dos espermatozoides do epidídimo. Em testes com cervídeos selvagens (*Cervus elaphus hispanicus*) a utilização de monossacarídeos no diluente de congelamento, principalmente frutose, melhoram a manutenção da viabilidade pós-descongelamento dos gametas do epidídimo, quando

comparado aos trissacarídeos (FERNANDEZ-SANTOS et al., 2007). Além disso, a adição de substâncias antioxidantes como a cisteína, análogo de vitamina E solúvel em água (THUWANUT et al., 2008), ou enzimas (THUWANUT et al., 2010), causam melhora na motilidade total, progressiva e a integridade de membranas plasmáticas pós-descongelamento de espermatozoides do epidídimo de gatos.

A ausência do plasma seminal nos espermatozoides obtidos do epidídimo parece ser um fator positivo na manutenção da integridade de membrana durante o processo de criopreservação. Além disso, a composição individual entre reprodutores pode afetar a resistência ao congelamento (AURICH et al., 1996). A incubação pós-descongelamento de espermatozoides do epidídimo de gatos com plasma seminal, ocasionou menor motilidade total e progressiva, e de integridade de membrana plasmática (THUWANUT e CHATDARONG, 2009). Por outro lado, há estudos que demonstram que realizar a ressuspensão dos espermatozoides do epidídimo com plasma seminal, é benéfico para a motilidade espermática pós-descongelamento (GRAHAM, 1994).

De uma forma geral, os estudos com criopreservação de espermatozoides do epidídimo são desenvolvidos a partir dos mesmos protocolos de criopreservação utilizados para sêmen convencional. O protocolo de congelamento de sêmen em vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos é eficaz na manutenção da viabilidade pós-descongelamento de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de garanhões (WEISS et al., 2008). Após criopreservação, os gametas obtidos do epidídimo podem ser destinados, sem prazo determinado, às técnicas de reprodução assistida.

5.4 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a biotecnologia reprodutiva que possibilita produção de grande número de embriões em laboratório, utilizada para promover o melhoramento genético, impedir descarte precoce de fêmeas impossibilitadas de reproduzir de forma natural ou via transferência de embriões (TE), além de ser considerada uma excelente ferramenta para estudo dos fenômenos biológicos que ocorrem desde a maturação dos oócitos até o início do desenvolvimento embrionário. Mais recentemente, a produção *in vitro* se tornou instrumento indispensável para aplicação de outras biotécnicas como a clonagem, a manipulação de genes e transferência de núcleos, sendo utilizada em escala comercial (GONÇALVES et al., 2007).

A PIVE em bovinos apresenta significativa expressão comercial e científica no país, havendo produção de aproximadamente 250 mil embriões ao ano, e é considerada técnica consolidada no Brasil (LIMA et al., 2014).

5.4.1 Colheita dos oócitos

Para aplicação da técnica *in vitro*, oócitos devem ser recuperados diretamente dos folículos presentes nos ovários das fêmeas, de duas formas: *in vivo* através da técnica de aspiração folicular transvaginal, OPU do inglês “Ovum Pick-up” (PIETERSE et al., 1988), ou após a morte, a partir da punção folicular em ovários obtidos em abatedouros (NEGLIA et al., 2003).

Ao utilizar ovários provenientes de abatedouros, o transporte até o laboratório deve ser feito em recipientes térmicos que mantenham a temperatura próxima a 35°C. O tempo transcorrido desde a obtenção dos ovários até a recuperação dos oócitos deve ser de três até cinco horas. No laboratório os ovários são mantidos em banho-maria com temperatura de 35°C até a colheita dos oócitos, utilizando agulha hipodérmica com calibre 18 G acoplada a uma seringa para aspiração manual dos folículos entre dois e oito mm de diâmetro (GONÇALVES et al., 2008).

A aspiração folicular em fêmeas vivas pode ser realizada duas vezes por semana durante várias semanas e a doadora de oócitos pode estar em qualquer fase do ciclo estral. É um procedimento minimamente invasivo e são coletados em média oito a 10 oócitos por OPU (GALLI et al., 2003). Em fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*) a média de oócitos recuperados é maior que em fêmeas taurinas (*Bos taurus taurus*), em média 18 oócitos por aspiração (WATANABE et al., 1999).

O diâmetro do folículo aspirado tem influência na qualidade, quantidade e na capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos recuperados em bovinos. É possível obter oócitos de folículos com um até nove mm de diâmetro em zebuínos, para maturação e fecundação *in vitro*. Porém folículos entre três e cinco mm fornecem no final do processo de aspiração dos ovários maior número de oócitos e com maior diâmetro quando comparados com folículos com nove mm ou mais (pré-ovulatórios). Os folículos maiores possibilitam a recuperação de um número pequeno de oócitos (ALVES et al., 2000). Na comparação da taxa de recuperação e a qualidade de oócitos de folículos grandes (> 4 mm), com aqueles recuperados de folículos pequenos (< 4 mm), o resultado é melhor quando são aspirados folículos pequenos e intermediários

(SENEDA et al., 2001). De uma forma geral é preferível realizar a aspiração de folículos intermediários (3 a 8 mm).

Além do tamanho do folículo de origem, outros fatores que interferem na qualidade do oócito são: qualidade do ambiente folicular, morfologia do complexo *cumulus-oócitos* (COC), condições de maturação e competência oocitária (CAIXETA et al., 2010). Segundo classificação descrita por Stojkovic et al. (2001), os oócitos que possuem multicamadas completas e compactas (pelo menos cinco) de células do cumulus, citoplasma homogêneo ou com poucas áreas de pigmentação irregular, tem maior capacidade de desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro*. Por outro lado, aqueles com citoplasma heterogêneo, vacuolizado ou pigmentado, e pouca ou nenhuma camada de células do cumulus, resultam em resultados inferiores na maturação *in vitro* (FIGURA 3).

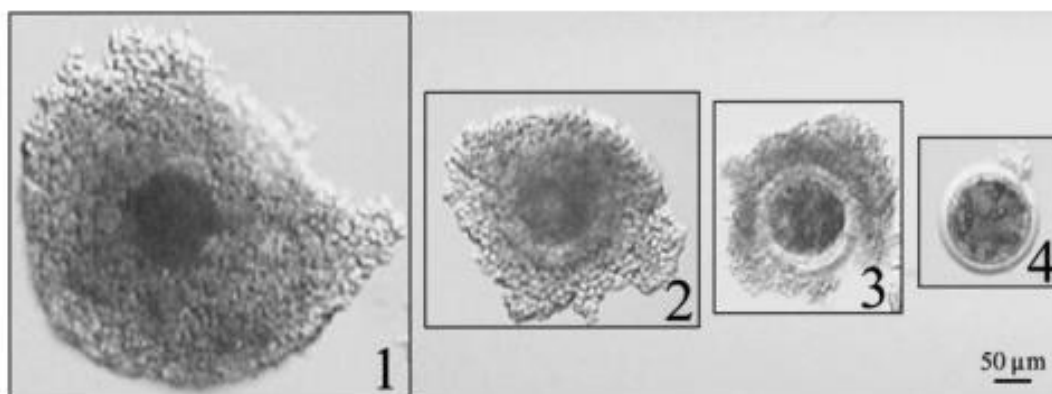


FIGURA 4 – QUATRO CATEGORIAS DE COMPLEXO CÚMULUS-OÓCITOS (COCS) DE BOVINOS, DETERMINADAS DE ACORDO COM A APARÊNCIA MORFOLÓGICA DO CITOPLASMA E DAS CÉLULAS DO CUMULUS. CATEGORIA 1 – OÓCITO COM CITOPLASMA HOMOGÊNIO E MULTICAMADAS COMPLETAS DE CÉLULAS DO CUMULUS; CATEGORIA 2- MULTICAMADAS (MAIS DE CINCO) DE CÉLULAS DO CUMULUS MENORES QUE NA CATEGORIA 1; CATEGORIA 3 – OÓCITO COM CITOPLASMA HETEROGÊNIO E TRÊS A CINCO CAMADAS DE CÉLULAS DO CUMULUS COMPLETAS OU NÃO; CATEGORIA 4 – OÓCITO COM CITOPLASMA HETEROGÊNIO E AUSÊNCIA DE CÉLULAS DO CUMULUS.

FONTE: STOJKOVIC et al. (2001).

Após a seleção dos oócitos, os três eventos biológicos seguintes, realizados no laboratório são: maturação, fecundação dos oócitos e o cultivo *in vitro* dos embriões até o estágio de blastocisto (GONÇALVES et al., 2007).

5.4.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Ao serem removidos do ambiente folicular pela aspiração, os oócitos deixam de ter o sinal que mantém o bloqueio meiótico, e reiniciam espontaneamente a meiose e as mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a fecundação. Para que se tornem competentes e possam ser fecundados pelo espermatozoide, é necessário que ocorram eventos fisiológicos para sua capacitação, principalmente transformações em seu citoplasma e núcleo. As células do cumulus participam diretamente do processo de maturação citoplasmática ocasionando melhores resultados pós-fecundação de desenvolvimento embrionário. Por serem essenciais no processo de maturação *in vitro*, essas células são utilizadas como critério para avaliação da qualidade oocitária (GONÇALVES et al., 2008).

Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, em meio próprio para maturação. O TCM199 é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, geralmente suplementado com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, piruvato e antibióticos (GONÇALVES et al., 2007). Cada laboratório estabelece um protocolo específico de acordo com seus melhores resultados.

5.4.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após a maturação, os oócitos devem ser fecundados para que se inicie a clivagem e o desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto. Para que as doses de sêmen possam ser utilizadas para fertilização, é necessário que haja seleção dos espermatozoides vivos e com motilidade progressiva. Isso inclui a exclusão dos gametas com defeitos morfológicos e demais componentes do sêmen e do diluente, prejudiciais ao processo de fertilização. Esse procedimento é denominado seleção espermática e os dois métodos mais utilizados são: migração ascendente (*Swim up*) e por gradiente de seleção (Percoll®). No *Swim up* os espermatozoides são depositados no fundo do tubo cônico anteriormente à centrifugação. Os viáveis são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes do diluente por migração ascendente. Já na separação pelo gradiente de seleção, o sêmen é depositado acima das camadas de gradiente com diferentes densidades e concentrações, ocasionando o deslocamento centrípeto dos espermatozoides viáveis e formação do pellet no fundo do recipiente após centrifugação (GONÇALVES et al., 2008).

Após separação, os espermatozoides selecionados com concentração conhecida são utilizados para fertilização das gotas contendo oócitos já capacitados. A concentração de pelo menos $0,125 \times 10^6$ de espermatozoides é suficiente para maximizar os resultados de fecundação e posterior desenvolvimento de embriões (WARD et al., 2003).

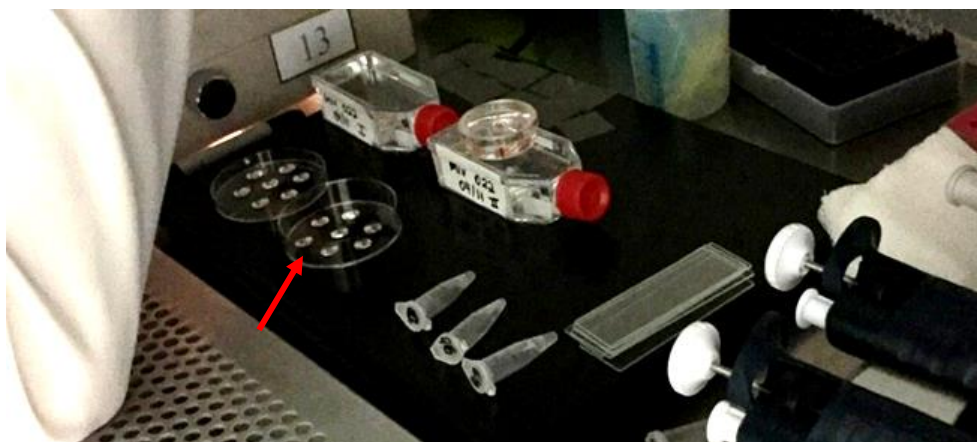


FIGURA 5 - PLACAS DE PETRI CONTENDO SETE GOTAS COM 30 OÓCITOS CADA, APÓS MATURAÇÃO *IN VITRO*. NESSE MOMENTO OS OÓCITOS SERÃO FERTILIZADOS COM OS ESPERMATOZOIDES SELECIONADOS.

FONTE: O AUTOR (2015).

5.4.4 Cultivo (CIV) e desenvolvimento embrionário *in vitro*

Após a fertilização, os oócitos são desnudados das células do cumulus e dos demais espermatozoides remanescentes, e incubados em temperatura e concentrações gasosas controladas, para dar início às divisões celulares e clivagem (GALLI e LAZZARI, 1996). Os meios utilizados para o cultivo devem ser capazes de dar suporte à nutrição celular e ao desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. Pode ser feito o co-cultivo dos embriões com células epiteliais do oviduto, células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO e células do cumulus (GONÇALVES et al., 2008).

É necessário que os embriões sejam mantidos em atmosfera de oxigênio reduzido, de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Os meios escolhidos variam conforme a rotina de cada laboratório. Os mais utilizados são: TCM-199, Ham F-10, meio básico

de Eagle com sais de Hank, com suplementos macromoleculares, entre outros (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Durante o cultivo, recomenda-se avaliar a taxa de clivagem, a partir de 48 horas após a fertilização, onde é observada a quantidade de embriões com duas, quatro ou oito células e a quantidade de ciclos celulares. A avaliação do desenvolvimento embrionário é feita através da contagem do número de mórulas, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos (FIGURA 5 e 6), entre o sétimo e o décimo dia após a fecundação. A quantidade de blastocistos e a taxa de eclosão são fundamentais para determinar a eficácia da maturação oocitária (GONÇALVES et al., 2008) e o sucesso da produção *in vitro*.

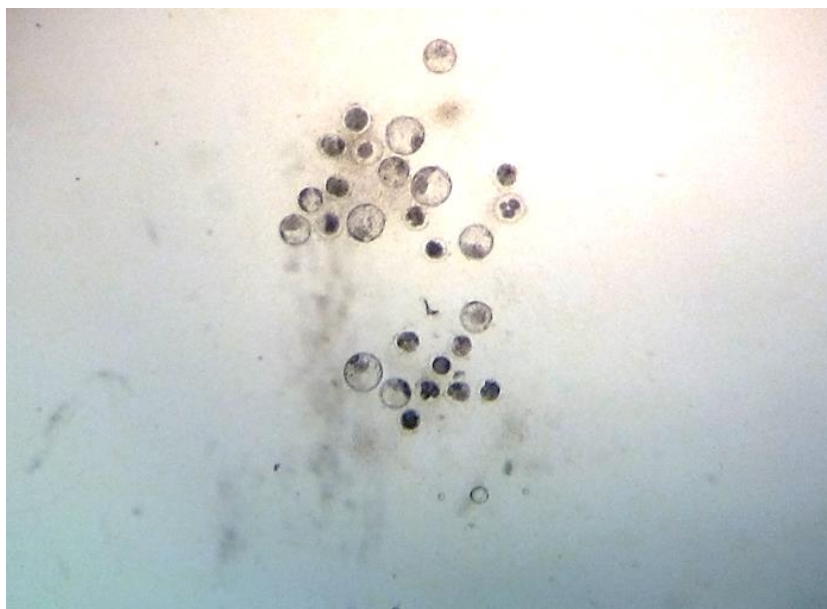


FIGURA 6 – IMAGEM OBTIDA EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE EMBRIÕES BOVINOS (BLASTOCISTOS) PRODUZIDOS *IN VITRO* COM SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

FONTE: O AUTOR (2015).

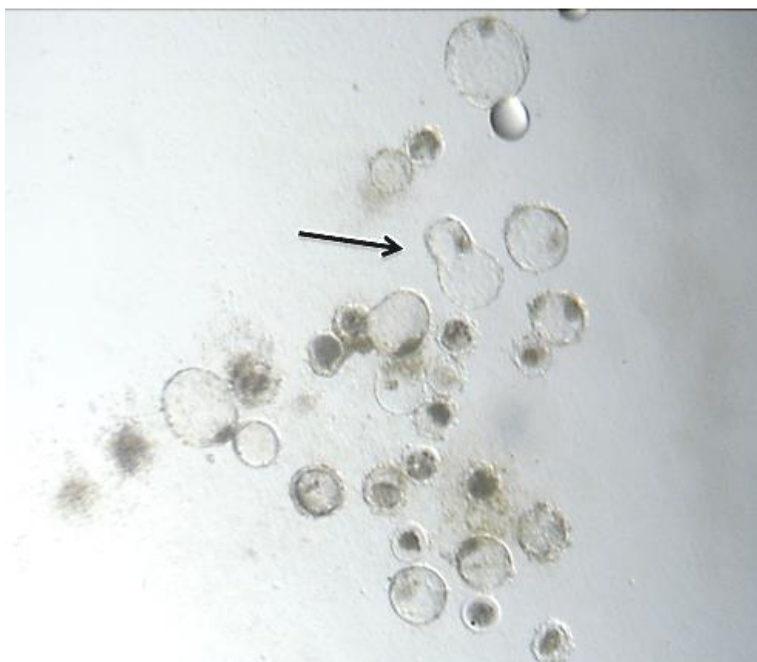


FIGURA 7 – IMAGEM OBTIDA EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE EMBRIÕES BOVINOS (BLASTOCISTO ECLODIDO, EM DESTAQUE) PRODUZIDOS *IN VITRO* COM OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

FONTE: O AUTOR (2015).

Para determinar a qualidade dos embriões, um método eficaz e pouco invasivo é a contagem do número total de células embrionárias. Além da relação com qualidade embrionária, o número de células também é afetado pelo estágio de desenvolvimento e pela idade do embrião (MORI et al., 2002).

Do total de oócitos que passam pela fase de maturação e fertilização, somente 30 a 40% desenvolvem-se até o estágio de blastocisto após cultivo *in vitro* (RIZOS et al., 2002). Além disso, os resultados são afetados pela variação individual existente entre touros (WARD et al., 2003), sendo considerados bons e maus produtores de embriões. Quando transferidos para as receptoras, o resultado esperado de prenhez é em torno de 50%. Hasler et al. (1995), compararam a taxa de prenhez de receptoras após a transferência de embriões em diferentes dias pós-fertilização, e obtiveram os

melhores resultados para embriões transferidos após sete dias de cultivo (D7) com uma taxa de prenhez de 56%, superior à descrita para embriões em D8 ou D9.

5.5 Fertilidade *in vivo* de espermatozoides do epidídimo

O teste final de fertilidade é a avaliação do potencial de fecundação *in vivo*, através da inseminação artificial. Os eventos biológicos que ocorrem no trato reprodutivo da fêmea, desde a ejaculação até a fecundação, ainda não são completamente conhecidos, não sendo possível reproduzi-los exatamente em laboratório.

Em relação à inseminação com espermatozoides do epidídimo, a literatura é escassa. Espermatozoides do epidídimo criopreservados foram utilizados na inseminação artificial de porcas e sete dias após a inseminação foi possível recuperar embriões viáveis, comprovando o potencial de fertilização *in vivo* dos gametas (KIKUCHI et al., 1999).

Éguas após indução da ovulação com acetato de deslorelina foram inseminação com espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões numa concentração total de 800×10^6 . Após realizar o diagnóstico de prenhez entre 12 e 15 dias após a inseminação, a taxa de prenhez foi de 92,3% para inseminação com espermatozoides recuperados logo após a orquiectomia e 61,5% quando a recuperação foi feita após 24 horas a 5°C (MONTEIRO et al., 2011).

Em bovinos, há relato de inseminação artificial com espermatozoides recuperados do epidídimo após permaneceram 24 e 72 horas em refrigeração (5°C). Foram utilizadas 10 vacas com observação de cio natural para determinar o momento

ideal para inseminação. O resultado foi de duas gestações com posterior nascimento de bezerros saudáveis (COSTA et al., 2011).

Nesse contexto, por haver poucos trabalhos com viabilidade, preservação e fertilidade de espermatozoides do epidídimo de touros, este estudo foi desenvolvido.

6. REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; GOMES-ALVES, S.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal Reproduction Science**, v. 132, p.145–154, 2012.
- ALVES, M.; DODE, N.; RODOVALHO, N.C.; GOMES, V.; GERALDO, R.; ALVES, D.E.O. Efeito Do Tamanho Do Folículo Na Maturação Nuclear E Citoplasmática De Ovócitos De Fêmeas Zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 207–214, 2000.
- AMANN, R.P. e ALMQUIST, J.O. **Reproductive capacity of dairy bulls**. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 260-268, 1962.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791–797, 1996.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1–7, 2000.
- BARBOSA, L.M.; KANAZAWA, M.Y.; PERES, A.R.; SOUZA, F.F. DE. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, p. 190–194, 2014.
- BARKER, C. A V. Low temperature preservation of bovine epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 18, p. 390–393, 1954.
- BARTH, A.D. e OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BERTOL, M.A.F. **Viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado

em Saúde Humana e Animal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, PR.

BERTOL, M.A.F.; WEISS, R.R.; TOMAZ-SOCCOL, V.; KOZICKI, L.E.; FUJITA, A.S.; DE ABREU, R.A.; GREEN, K. T. 2013. Viability of Bull Spermatozoa Epididymis Stored at 18-20°C Collected from the. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 777–783, 2013.

BERTOL, M.A.F.; WEISS, R.R.; FUJITA, A.S.; KOZICKI, L.E.; DE ABREU, A.C.M.R.; PEREIRA, J.F.S. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1658–1663, 2014.

BRUEMMER, J.E. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 677–682, 2006.

CAIXETA, E.S.; ALVES, M.; DODE, N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, p. 8–18, 2010.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v. 18, p.1–8, 2010.

COOPER, T.J. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 130-138, 2011.

COSTA, P.D.M.; MARTINS, C.F.; FRANCO, V.D.O.; REZENDE, L.O.F.; SERENO, J.R.B.; CAMPOS, H.D.C.F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozóides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciência Rural**, v. 41, p. 869–874, 2011.

DBO - Revista. **Os números da Pecuária, Anuário 2016**. Ano 34, nº423, 2016.

EHLING, C.; RATH, D.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. **Theriogenology**, v. 66, p. 2160–2164, 2006.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; SOLER, A. J.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; GARDE, J.J. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 738–753, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Basic principles of cryopreservation. Cryoconservation. **Animal Genetic Resource**, p. 85–94, 2013.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599–616, 2003.

GALLI, C. e LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371–379, 1996.

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v. 72, p. 1268–1277, 2009.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte 1. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212–217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.de; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

GRAHAM, J.K. Effect os seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the criopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, p. 1151–1162, 1994.

HAFEZ, E.S.E. e HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: Barueri, São Paulo. 2004. 513p.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine ivf embryos and and subsequent calving results. **Theriogenology**, p. 141–152, 1995.

HEISE, A.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 192–201, 2011.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. **Theriogenology**, v. 66, p. 1123–1130, 2006.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, p. 1249–1259, 2003.

KIKUCHI, K.; KASHIWAZAKI, N.; NAGAI, T.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; TAKAHASHI, R.; HIRABAYASHI, M.; SHINO, M.; UEDA, M.; KANEKO, H. Reproduction in Pigs Using Frozen-Thawed Spermatozoa from Epididymis Stored at 4°C. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, p. 345–350, 1999.

LIMA, J.M.P.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; BEZERRA, M.B. Progresso metodológico e sua influência na produção in vitro de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 135–140, 2014.

LONE, F. A.; ISLAM, R.; KHAN, M.Z.; SOFI, K. A. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 54–59, 2011.

LOPES, G.; SOARES, L.; FERREIRA, P.; ROCHA, A. Tris-Egg Yolk-Glycerol (TEY) Extender Developed for Freezing Dog Semen is a Good Option to Cryopreserve Bovine Epididymal Sperm Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 97–103, 2015.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A. R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, p. 24–40, 2005.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P.M.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v.116, p. 50–57, 2009.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C.; SANT'ANNA, M.C.; TRAUTWEIN, L.G.C.; SOUZA, F.F. Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 293–294, 2012.

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELLAQUA, J. A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 197–201, 2011.

MORI, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 181–184, 2002.

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. 2006. Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 69–74, 2006.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G.A.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123–1130, 2003.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209–222, 1992.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A.; TAVERNE, M. A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751–762, 1988.

PONTES, A., 2011. **Fábrica de Touros**. Dinheiro Rural. Disponível em:< <http://dinheirorural.com.br/secao/agronegocios/fabrica-de-touros>>, Acesso em: Janeiro/2016.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–248, 2002.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, v. 1. 3 ed. p. 1071–1148, 2006.

ROSS, A D.; ENTWISTLE, K.W. The effect of scrotal insulation on spermatozoa morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. **Theriogenology**, v. 11, p. 111–129, 1979.

SCOT CONSULTORIA. **Cotações boi gordo**. Disponível em <<https://www.scotconsultoria.com.br>. 2016>. Acesso em: Janeiro/2016.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; DE OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.

SKANDHAN, K.P. Hypothesis: Epididymis inhibits sperm motility inside male reproductive tract. **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 146–150, 2004.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S.P. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **Journal of Experimental Zoology**, v. 280, p. 189–196, 1998.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001.

TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 188–199, 2011.

THUWANUT, P. e CHATDARONG, K. Incubation of post-thaw epididymal cat spermatozoa with seminal plasma. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 381–384, 2009.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; JOHANNISSON, A.; BERGQVIST, A. S.; SÖDERQUIST, L.; AXNÉR, E. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. **Theriogenology**, v. 73, p. 1076–1087, 2010.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 233–240, 2008.

TURRI, F.; MADEDDU, M.; GLIOZZI, T.M.; GANDINI, G.; PIZZI, F. Influence of Recovery Methods and Extenders on Bull Epididymal Spermatozoa Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 712–717, 2012.

VARISLI, O.; UGUZ, C.; AGCA, C.; AGCA, Y. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 256–268, 2009.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.

WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. **Theriogenology**, v. 59, p. 1575–84, 2003.

WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in nelore cows per session and in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 51, p. 438, 1999.

WEISS, R.R.; MURADÁS, P.R.; GRANEMAN, L.C.; MEIRA, C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 356, 2008. (Abstract)

YU, I. e LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v. 57, p. 1179–1190, 2002.

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS E PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DIREITOS E ESQUERDOS DE TOUROS ZEBUÍNOS¹***Biometrics and sperm parameters between right and left testes and epididymis of zebu bulls***

Melina Andrea Formighieri Bertol^{2*}, Romildo Romualdo Weiss², Luiz Ernandes Kozicki³,
Ana Cláudia Machinski Rangel de Abreu⁴

¹ ISSN 1517-784X. BERTOL, MELINA ANDREA FORMIGHIERI; WEISS, ROMILDO ROMUALDO ; KOZICKI, LUIZ ERNANDES ; DE ABREU, A.C.M.R. . **Características biométricas e parâmetros espermáticos de testículos e epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos**. Archives of Veterinary Science, v. 20, p. 156-163, 2015.

²Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 80035-050, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: melbertol@hotmail.com

³ Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), Curitiba, PR, Brasil.

⁴ Médica veterinária autônoma.

*Autor para correspondência: melbertol@hotmail.com

RESUMO

A capacidade reprodutiva de touros é um dos principais fatores que interfere no ganho em produtividade e consequentemente no sucesso da bovinocultura de corte. Os objetivos do estudo foram: comparar os testículos e epidídimos direitos e esquerdos de touros, quanto à dimensão, peso e parâmetros espermáticos, e verificar a correlação entre o peso do testículo e a reserva espermática no epidídimo. Dez touros da raça Tabapuã com idade entre 36 e 84 meses, foram submetidos à orquiectomia para obtenção e mensuração das estruturas do aparelho sexual externo, e posterior colheita de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo por fluxo retrógrado. O comprimento, largura e altura testicular foram semelhantes ($p>0,05$). Em relação aos parâmetros espermáticos, os valores médios encontrados para os lados direito e esquerdo foram, respectivamente: motilidade total 63,5 e 62,5%, vigor 4,6 e 4,5, total de defeitos morfológicos 14,7 e 16,8% e concentração por mL de $243,75 \times 10^6$ e $254,25 \times 10^6$, não diferindo entre si ($p>0,05$). Há correlação negativa, moderada e não significativa ($r=0,20$; $p>0,05$) entre a concentração espermática e o peso testicular. Concluímos que ambos os testículos e epidídimos de um touro possuem dimensões e peso semelhantes e mantêm uma produção de gametas com motilidade, vigor, morfologia e concentração similares.

Palavras-chave: *Bos indicus*, sêmen, reprodução

ABSTRACT

The reproductive capacity of bulls is one of the main factors that interfere in productivity gains with the consequent of success in beef cattle. This study aims to compare the differences between rights and left epididymis and testicles of zebu bulls, as the size, the weight and sperm parameters, and also to verify the correlation between the concentration of sperm on epididymis with testicular weight. We use 10 Tabapuã bulls, between 36 and 84 months of age, that were castrated by bilateral orchiectomy with local anesthesia, and after that the sperm were recovery directly from the epididymal tail by retrograde flow. The length, width, height and weight of both testis were similar ($P>0.05$). Considering the results to sperm parameters, the mean values for the right and left sides were respectively: total motility 63.5 and 62.5%, vigor 4.6 and 4.5, total morphological defects 14.7 and 16.8% and concentration per mL 243.75×10^6 and 254.25×10^6 , not differing ($P>0.05$). Negative, moderate and not significant correlation ($r=0.20$; $P>0.05$) was observed between the concentration of sperm and testicular weight. We concluded that both testes and bull epididymides have similar dimensions and weight and maintain constant production of gametes with similar motility, morphology and concentration.

Key words: *Bos indicus*, sperm, reproduction

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é um dos pilares do agronegócio brasileiro gerando um faturamento de mais de R\$ 59 bilhões/ano e oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos (ABIEC, 2010). O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo chegando a 215,2 milhões de cabeças e produz anualmente cerca de 9,2 milhões de toneladas de carne bovina em área aproximada de 160 milhões de hectares de pastagens (CONAB, 2015).

A capacidade reprodutiva de touros é um dos fatores determinantes para o aumento da produtividade e consequentemente sucesso da bovinocultura de corte (SANTOS et al., 2004), visto que a fertilidade do rebanho está diretamente relacionada ao número de fêmeas gestantes (SILVA et al., 2002). Segundo Moura et al. (2002) e Salvador et al. (2003), admite-se que o reprodutor possa ser responsável por mais de 90% do potencial genético de um rebanho. Por esse motivo torna-se fundamental o conhecimento da sua real capacidade reprodutiva. Alguns parâmetros como a qualidade do sêmen e as medidas testiculares têm sido propostos para estimar a aptidão reprodutiva do macho, destacando a aferição do perímetro escrotal em função da fácil execução e por ter alta herdabilidade, repetibilidade e correlação positiva com o peso corporal, idade à puberdade de machos e fêmeas, dentre outras características de interesse econômico (PEREIRA et al., 2000). Além de ser muito utilizado em programas de melhoramento genético de bovinos (SIQUEIRA et al., 2013).

Caldas et al. (1999) e Viu et al. (2006) concluíram que, além do perímetro escrotal, o volume, peso e formato testicular podem ser parâmetros úteis na seleção de reprodutores. Somente a circunferência escrotal não constitui medida representativa da

produção espermática, sendo que o volume testicular pode ser complementar para representar esta produção (BAILEY et al., 1996; CALDAS et al., 1999; UNANIAN et al., 2000). De acordo com Bailey et al. (1998), os testículos mais longos apresentam maior superfície de contato com o ambiente, o que facilita a termorregulação, além de que a distribuição dos vasos sanguíneos e do tecido espermático é mais uniforme. Assim, as formas testiculares mais alongadas seriam mais vantajosas à reprodução. Animais com o mesmo perímetro escrotal, porém com comprimentos testiculares diferentes, apresentam maior volume testicular quanto maior for o comprimento e, portanto maior produção espermática (GUIMARÃES, 1997). Entende-se que o par de testículos de um reprodutor possua características semelhantes, porém não há na literatura estudos que comparem as dimensões testiculares de um mesmo reprodutor bovino relacionando com a eficiência da produção de gametas e a reserva no epidídimo. A informação torna-se útil, nos casos de comprometimento testicular unilateral, auxiliando no prognóstico reprodutivo do macho e também no esclarecimento da fisiologia normal do aparelho genital masculino.

Os objetivos deste estudo foram comparar as dimensões, o peso e os parâmetros espermáticos (motilidade total, vigor, morfologia espermática e concentração) dos testículos e epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos, bem como verificar se há correlação entre o peso testicular e a reserva espermática no epidídimo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma fazenda de bovinos de corte e animais de elite situada no Sudoeste do estado do Paraná, Brasil (latitude 25°37'0.4.4''sul, longitude 52°48'58.9'' oeste e altitude de 505 m). Dez touros puros de origem da raça Tabapuã

(*Bos taurus indicus*) com idade entre 36 e 84 meses e peso médio de $560 \pm 111,3$ Kg foram selecionados, após exame andrológico completo com resultados de avaliação espermática suficientes para a espécie segundo CBRA (1998). Uma semana após colheita de sêmen por eletroejaculação para realização do exame andrológico, os touros foram submetidos à orquiectomia para obtenção dos testículos e epidídimos. Os órgãos foram separados em dois grupos, direito e esquerdo (n=10).

Para a realização da orquiectomia, os animais foram controlados em tronco de contenção e imobilizados empregando-se uma estrutura metálica arredondada de aproximadamente três metros de comprimento por quinze centímetros de diâmetro, mantida na altura do jarrete e tracionada no sentido caudo-cranial, induzindo a suspensão dos membros pélvicos do animal. A técnica cirúrgica utilizada foi a descrita por Turner e McIlwraith (2002), mediante incisão medial e utilização de anestesia local, no cordão espermático e no local da incisão no testículo, com lidocaína 2% sem vasoconstritor. Após o procedimento, os órgãos foram lavados com solução fisiológica previamente aquecida a 37°C, e dissecados das demais estruturas anexas a eles, o cordão espermático foi seccionado na sua porção proximal ao testículo. Os dez testículos e epidídimos obtidos foram identificados conforme a posição anatômica no animal em direito e esquerdo, e alocados em seus respectivos grupos.

As estruturas (FIGURA 1) foram pesadas em balança digital, juntas e em seguida, individualmente. Para aferição das medidas testiculares (comprimento, largura e altura) utilizou-se fita flexível graduada em centímetros. Os valores foram somados para obtenção da média aritmética de cada grupo. O mesmo técnico realizou as mensurações de todas as estruturas para minimizar variações que pudessem interferir nos resultados.

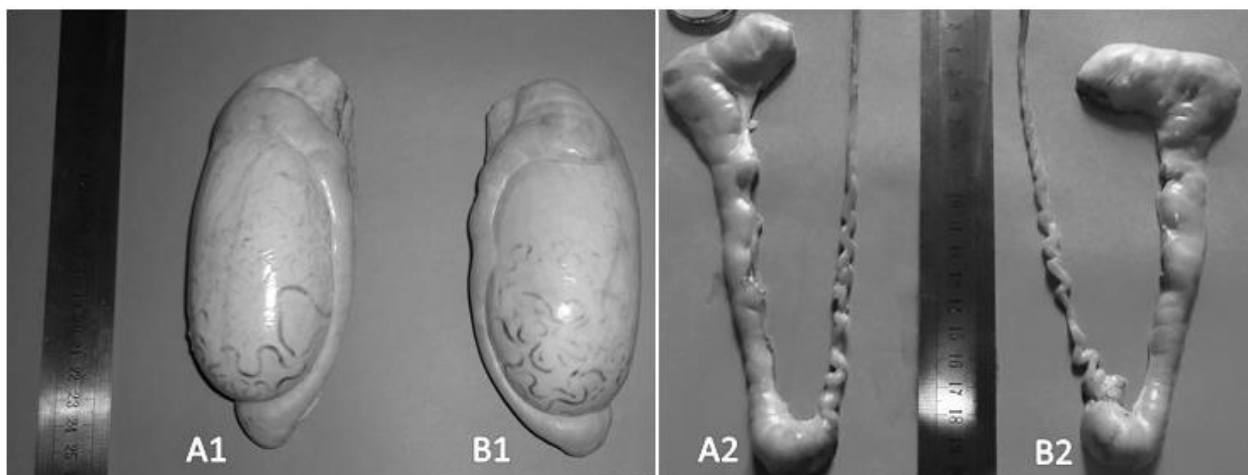


FIGURA 1 – A1 -TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO ESQUERDO; B1 - TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO DIREITO; A2 – EPIDÍDIMO ESQUERDO; B2 – EPIDÍDIMO DIREITO, DE TOUROS ZEBUÍNOS.

FONTE: O AUTOR (2015).

Na sequência, foi realizada a colheita dos espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006) adaptada para bovinos. A região da cauda e o ducto deferente foram isolados do corpo e da cabeça do epidídimo com cautela para que ambos permanecessem intactos. Após dissecação precisa do ducto deferente e da porção final do ducto epididimário, a cauda do epidídimo foi perfundida com diluente a base de leite em pó desnatado (Botu-turbo[®]) aquecido a 37°C e com osmolaridade corrigida para a espécie bovina (20 mL de água destilada para cada 100 mL do meio).

A solução foi injetada no lúmen do ducto deferente mediante a delicada introdução de uma agulha hipodérmica de 0,7 mm acoplada a uma seringa de três mL. O diluente seguiu o trajeto inverso ao fisiologicamente percorrido pelos espermatozoides e após aplicação de pressão, o conteúdo emergiu por um corte feito

na junção do corpo com a parte proximal da cauda do epidídimo. O procedimento foi repetido até completar o volume fixo de 20 mL de diluente por cauda do epidídimo.

Os espermatozoides diluídos foram depositados em um recipiente de vidro aquecido e transferidos para um banho-maria a 29°C por uma hora para adaptação e estabilização das células espermáticas e também para o desprendimento espontâneo das gotas citoplasmáticas distais. Decorrido esse tempo, uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação.

A motilidade espermática total foi determinada de forma subjetiva através da observação da porcentagem (0 a 100%) de espermatozoides móveis, e o vigor, que representa a força de deslocamento das células foi pontuado numa escala de 0 a 5. Para avaliação, uma gota de amostra (espermatozoides do epidídimo diluídos) de aproximadamente 15µL foi depositada entre lâmina e lamínula aquecidas (37°C) e levada ao microscópio ótico binocular em um aumento de 400 vezes. Para determinação do valor final de motilidade e vigor, cinco campos foram avaliados para obtenção de uma média final de cada amostra do grupo, que posteriormente gerou a média final do grupo.

Para determinação da morfologia dos espermatozoides, foi feito esfregaço delgado em lâmina pré-aquecida a 37°C e corada com vermelho congo (CBRA, 1998). Após coloração as lâminas foram observadas no microscópio ótico em aumento de 1.000 vezes, em imersão. Foram avaliadas 200 células para determinação do número total de espermatozoides com defeitos morfológicos. A concentração espermática foi determinada em hemocitômetro à diluição de 1:100 (sêmen: solução de formol-salino tamponado). O resultado foi dado em número de células/mL e ao multiplicar o valor pelo volume total da amostra obteve-se o número total de espermatozoides.

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados de distribuição não Gaussiana ou para as variáveis categóricas ordinais usou-se o teste de Kruskal–Wallis (motilidade total e vigor), com o pós-teste de Dunn. Para as variáveis contínuas numéricas de distribuição Gaussiana (concentração/mL) empregou-se o teste ANOVA, com o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Para execução da estatística descritiva e inferencial usou-se o software StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando comparamos as características biométricas entre testículos e epidídimos direito e esquerdo de bovinos encontramos valores semelhantes ($p > 0,05$), os valores encontrados para o comprimento, largura e o peso estão descritos na TABELA 1. Entende-se que os dois testículos nos bovinos apresentam similaridade de desenvolvimento e morfologia e função fisiológica durante o crescimento do animal, corroborando com Unanian et al. (2000), Pastore et al. (2008) e Machado et al. (2012), que constataram através de análises comparativas que não houve diferença numérica significativa entre as medidas dos testículos direito e esquerdo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DIREITO E ESQUERDO DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*).

	Direito (n=10)	Esquerdo (n=10)
Peso Total (g)	311,8 ± 104,4 ^a	300,5 ± 104,1 ^a
Peso Testículo (g)	275,4 ± 93,8 ^a	265,7 ± 94,8 ^a
Peso Epidídimo (g)	34,7 ± 9,9 ^a	33,7 ± 10,08 ^a
Comprimento (cm)	13,2 ± 1,7 ^a	12,9 ± 1,5 ^a
Largura (cm)	6,5 ± 1,1 ^a	6,4 ± 1 ^a
Altura (cm)	4,84 ± 0,4 ^a	4,7 ± 0,5 ^a

a= Teste T não pareado com nível de significância de 0,05%, letras iguais na mesma linha não diferem entre si.

Silveira et al. (2010), ao analisarem 5.903 touros da raça Nelore, com média de 21 meses de idade, não encontraram diferenças entre as medidas dos lados direitos e esquerdos, sendo detectados nesses animais valores de comprimentos testiculares esquerdo (11,21 ± 0,98 cm) e direito (11,26 ± 0,97 cm), larguras testiculares esquerda (5,92 ± 0,44 cm) e direita (5,97 ± 0,46 cm), valores estes próximos aos descritos no presente estudo no qual as medidas médias de comprimento e largura testiculares foram semelhantes para os lados direito e esquerdo, assim como os valores encontrados para o peso dessas estruturas. O alto desvio padrão na soma dos valores de cada grupo pode ser explicado pela variação de idade entre os reprodutores, ocasionando diferenças de mais de 100 gramas no peso total entre os indivíduos. Touros com idade mais avançada e tempo mais prolongado em atividade sexual apresentam fisiologicamente maior circunferência escrotal e maior quantidade de parênquima testicular, aumentando o peso testicular (AMANN e ALMQUIST, 1962).

Os valores obtidos para os parâmetros de viabilidade dos espermatozoides recuperados da cauda dos epidídimos direito e esquerdo estão apresentados na TABELA 2. A motilidade total, vigor, espermatozoides morfolologicamente deformados e

a concentração (total e por mL) não diferiram ($p>0,05$) entre direito e esquerdo em touros zebuínos. Goovaerts et al. (2006), encontraram diferenças entre os lados direito e esquerdo nos parâmetros avaliados (concentração, morfologia e padrões de movimentação) em espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo de touros de origem europeia (*Bos taurus taurus*). Variações na concentração total de espermatozoides podem ser explicadas pela eficiência da técnica de colheita (fluxo retrógrado) e a experiência do técnico que a executa.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE VIABILIDADE DE ESPERMATOZOÍDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DIREITO E ESQUERDO DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*).

Lado (n=10)	MT (%)	Vigor	EMD (%)	Concentração total (10^6)	Concentração.mL (10^6)
Direito (D)	63,5 ^a	4,6 ^a	14,7 ^a	4875 ^a	243,75 ^a
Esquerdo (E)	62,5 ^a	4,5 ^a	16,8 ^a	5085 ^a	254,25 ^a

MT, Motilidade total; EMD, Espermatozoides morfologicamente deformados.

a = Teste T não pareado com nível de significância de 0,05%. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si.

As relações entre os parâmetros espermáticos e as características biométricas dos testículos têm sido estudadas por diversos autores. Segundo Dias et al. (2008), as correlações genéticas favoráveis entre circunferência escrotal e características físicas e morfológicas do sêmen são indicação de que a circunferência escrotal é um parâmetro adequado e pode ser usada como critério de seleção em programas de melhoramento visando maiores crescimento corporal e fertilidade.

Segundo Pastore et al. (2008), a característica perímetro escrotal apresenta correlação positiva com o volume testicular, a motilidade e o vigor espermático. Godfrey e Dodson (2005) observaram melhor motilidade e menor incidência de patologias espermáticas com o aumento do perímetro escrotal, assim como, Viu et al. (2006) que

obtiveram uma correlação negativa entre os defeitos espermáticos com o volume e formato testiculares, além do perímetro escrotal. No presente estudo não foi avaliado o perímetro escrotal e o volume testicular dos touros, nem correlacionados com os parâmetros de viabilidade espermática, uma vez que o objetivo principal foi a comparação entre os lados direito e esquerdo.

Quando considerada a possibilidade de relação entre a concentração de espermatozoides por mL recuperados da cauda do epidídimo, ou seja, a reserva espermática com o peso dos testículos (parênquima testicular), o que observamos é que não ocorre uma função linear demonstrando baixa correlação ($r=0,20$). A função obtida após plotagem dos dados pode ser descrita pela fórmula: $Y=202,827+0,272 * X$; $R^2=0,207$ e não segue uma constante (FIGURA 2). Isso sugere que outros fatores estão diretamente envolvidos com a quantidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo dos touros, havendo grande variação nesse parâmetro. Entre eles a habilidade do técnico no momento de realização da colheita dos espermatozoides, o método utilizado, a idade do reprodutor. Aguiar et al. (2006) mostraram resultados que evidenciam a existência de uma relação cronológica entre os níveis periféricos de gonadotrofinas e esteroides, a espermatogênese e o desenvolvimento testicular em touros Angus. Em ovinos, há baixa e moderada correlação das medidas testiculares e epididimárias com a concentração de espermatozoides recuperados do epidídimo nessa espécie (MONTEIRO, 2007). Para Amann e Schamberger (1983), o peso testicular apresenta alta correlação com a produção de espermatozoides.

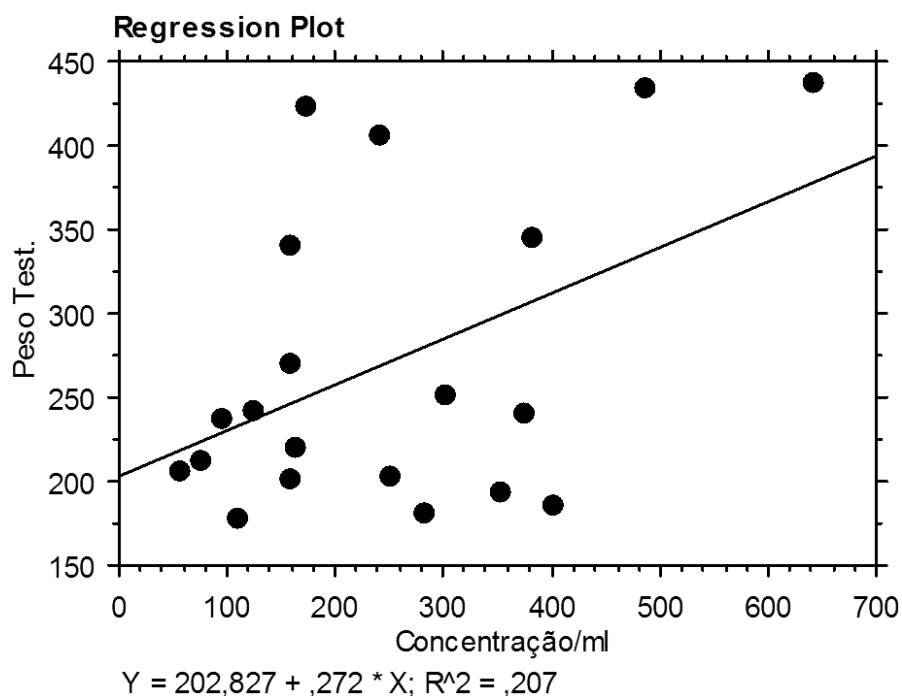


FIGURA 2 – GRÁFICO DA FUNÇÃO OBTIDA APÓS PLOTAGEM DOS DADOS DO PESO TESTICULAR, E DA CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES POR ML OBTIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO APÓS ORQUIECTOMIA DE TOUROS ZEBUÍÑOS.

Os dados obtidos nesse estudo comprovam que ambos os testículos de um reprodutor da espécie bovina possuem características e funções análogas assim como os outros órgãos pares do organismo. Além disso, quando houver comprometimento testicular unilateral, a função reprodutiva pode ser mantida.

Com o maior conhecimento da anatomia e fisiologia dos espermatozoides do epidídimo, torna-se indicado investigar o desempenho dos espermatozoides do epidídimo nas biotecnologias da reprodução animal, como a criopreservação, fertilização *in vitro* e inseminação artificial.

4. CONCLUSÃO

Ambos os testículos e epidídimos (direito e esquerdo) de touros zebuínos possuem dimensões (comprimento largura e altura) e peso semelhantes. Os parâmetros espermáticos avaliados: motilidade, vigor, morfologia e concentração dos espermatozoides colhidos diretamente da cauda do epidídimo não diferiram ($p>0,05$) entre lado direito e esquerdo. Há baixa correlação entre a concentração dos espermatozoides do epidídimo e o peso testicular em gramas.

5. AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, G.V.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006.

AMANN, R.P. e ALMQUIST, J.O. **Reproductive capacity of dairy bulls**. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 260-268, 1962.

AMANN, R.P. e SCHAMBACKER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 2, p. 379-403, 1983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Pecuária brasileira, 2010**.

BAILEY, T.L.; HUDSON, R.S.; POWE, T.A. et al. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v. 49, n. 10, p. 581-598, 1998.

BAILEY, T.L.; MONKE, D.; HUDSON, R.S. et al. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 881-887, 1996.

CALDAS, M.E.; PINHO, T.G.; PINTO, P.A. et al. Avaliação da biometria e morfologia testicular de touros jovens da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 210-212, 1999.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: CONAB. **Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos**.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS EMERICK, L.L. et al. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, 2008.

GODFREY, R.W. e DODSON, R.E. Breeding soundness evaluations of Senepol bulls in US Virgin Islands. **Journal of Animal Science**, v. 63, 2005.

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFLACK, G.G.; VAN SOOM, A. et al. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyzer indicates variation between the two caudae epididymides of same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GUIMARÃES, J.D. **Avaliação andrológica e estudos quantitativos e qualitativos da espermatogênese de touros mestiços FI Holandês x Zebu e Red Angus x Zebu**. 1997. Belo Horizonte. 186f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

MACHADO, P.P.; SOUSA, A.L.; REIS, L.F. et al. Modelos matemáticos e correlações de medidas morfométricas testiculares de Bovinos Zebuínos e Azebuados abatidos em São Luís, MA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, 2012.

MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Comparasion of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471-485, 2006.

MONTEIRO, A.W.U. **Biometria testículo epididimária e reserva espermática de ovinos deslanados sem padrão racial definido**. 2007. Fortaleza, 42f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará.

MOURA, A.A.A.; RODRIGUES, G.C.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 934-943, 2002.

PASTORE, A.A.; TONIOLLO, G.H.; LÔBO, R.B.; et al. Características biométricas, testiculares, seminais e parâmetros genéticos de touros pertencentes ao programa de melhoramento genético da raça Nelore. **Ars Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 134-141, 2008.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1676-1683, 2000.

SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. et al. Avaliação da libido de touros Nelore adultos em curral e sua associação com características andrológicas e desempenho reprodutivo a campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 588-593, 2003.

SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, 2004.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T. et al. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 1157-1165, 2002.

SILVEIRA, T.S.; SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, S.E.F. et al. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; PINHO, R.O. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 1, p. 3-13, 2013.

TURNER, A.S.; McILWRAITH C.W. **Técnicas Cirúrgicas em Animais de Grande Porte**. São Paulo: Roca, 2002. 341p.

UNANIAN, M.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C. et al. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, 2000.

VIU, M.A.O.; MAGNABOSCO, C.U.; FERRAZ, H.T. et al. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 53-57, 2006.

CAPÍTULO III

**DOIS DILUENTES COMERCIAIS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS⁵*****Two commercial extenders for cryopreservation of epididymal bull sperm***

Melina Andrea Formighieri Bertol^{6*}, Romildo Romualdo Weiss⁶, Aline Silva Fujita⁷,
Luiz Ernandes Kozicki⁸, Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu⁷, João Filipi Scheffer
Pereira⁸.

⁵doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130747>. BERTOL, MELINA ANDREA FORMIGHIERI; WEISS, ROMILDO ROMUALDO ; FUJITA, ALINE SILVA ; KOZICKI, LUIZ ERNANDES ; ABREU, ANA CLAUDIA MACHINSKI RANGEL DE ; PEREIRA, JOÃO FILIPI SCHEFFER . **Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros**. Ciência Rural (UFSM. Impresso), v. 44, p. 1658-1663, 2014.

⁶ Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 80035-050, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: melbertol@hotmail.com.

⁷ Médica veterinária autônoma.

⁸ Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), Curitiba, PR, Brasil.

*Autor para correspondência: melbertol@hotmail.com

RESUMO

A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo constituem alternativas viáveis para a preservação de material genético de animais valiosos. O objetivo deste estudo foi comparar o desempenho de dois diluentes comerciais Botu-Bov[®] (BB) e Bovimix[®] (BV), sobre a viabilidade pós-descongelamento de espermatozoides do epidídimo de touros Tabapuã (*Bos taurus indicus*) pós-orquiectomia. Os espermatozoides foram colhidos da cauda de 20 epidídimos utilizando a técnica de fluxo retrógrado, centrifugados e diluídos com BB ou BV para posterior criopreservação a -196°C. Após descongelamento, as amostras foram avaliadas utilizando a análise computadorizada (CASA) e por análises microscópicas para a determinação da integridade de membranas plasmáticas, acrossomal e morfologia espermática. A avaliação estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, com nível de significância ($p < 0,05$). Os resultados do movimento espermático avaliados no CASA, não diferiram para o diluente BB e BV. Também não foi observada diferença significativa entre os grupos na porcentagem de espermatozoides morfológicamente deformados, defeitos de acrossoma e espermatozoides com membrana plasmática íntegra após o descongelamento. Conclui-se que ambos os diluentes (BB e BV) são eficientes e podem ser utilizados na tecnologia do congelamento de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de touros, não apresentando diferença na viabilidade espermática para os parâmetros estudados.

Palavras-chave: diluente, viabilidade espermática, epidídimo, análise computadorizada do sêmen (CASA).

ABSTRACT

Recovery and cryopreservation of epididymal spermatozoa is a viable alternative for preservation of genetically valuable animals. The aim of this study was to verify and to compare the effect of two commercial extenders for conventional semen on post thawing viability of bovine epididymal sperm. For this purpose, the spermatozoa was recovered from the tail of 20 epididymis of Tabapuã bulls (*Bos taurus indicus*) using retrograde flow method. After sperm recovery, the cells were centrifuged and divided for dilution with the diluents Botu-Bov[®] (BB) or Bovimix[®] (BV) for cryopreservation at -196°C. After thawing, all samples were evaluated using computer assisted sperm analysis (CASA), and by microscopic analysis for determination of integrity of plasma and acrossomal membrane and morphology. Statistical evaluation was performed by analysis of variance (ANOVA) with post-test for multiple comparisons, the Tukey-Kramer test, with significance level ($P < 0.05$). The results of the sperm movement for diluent BB and BV evaluated with CASA, showed no difference for both ($P > 0.05$). There was also no difference between the percentage of deformed sperm, acrosome defects and the sperm with intact plasma membrane after thawing with BB or BV. We conclude that both extenders (BB and BV) are efficient and can be used for freezing sperm collected from the epididymis of bulls, showing no difference for all the parameters studied.

Key words: extender, sperm viability, epididymis, computer assisted sperm analysis (CASA).

1. INTRODUÇÃO

A recuperação e criopreservação de espermatozoides do epidídimo é uma ferramenta biotecnológica para recuperar material genético mesmo após a morte de animais de alto valor zootécnico ou ameaçados de extinção (KAABI et al., 2003). A criopreservação dos espermatozoides do epidídimo após a colheita possibilita seu aproveitamento de forma mais eficiente e econômica, pois permite a utilização por tempo indeterminado em programas de inseminação ou fecundação in vitro e não apenas logo após a morte do animal, como ocorre caso esse material não seja preservado (MARTINS et al., 2007). Alguns autores relataram, com sucesso, a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de bovinos (MARTINS et al., 2007; COSTA et al., 2011).

A utilização do sêmen bovino criopreservado apresenta vantagens em relação às demais formas de processamento, possibilitando o acesso do comércio mundial à genética de diferentes touros, além de atuar na prevenção da disseminação de doenças passíveis de transmissão por meio de monta natural (VERBERCKMOES et al., 2005), entretanto, geralmente fornece menores taxas de fertilidade em relação ao sêmen fresco. Os principais fatores envolvidos nessa queda de fertilidade são as mudanças de temperatura durante o processamento, o estresse osmótico e tóxico representado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de cristais de gelo extracelulares (WATSON, 2000).

O sucesso da congelação espermática depende da efetividade do processamento que atua no bloqueio completo dos processos metabólicos

desenvolvidos pelas células espermáticas (VISHWANATH e SHANNON, 2000), e a interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade celular e sucesso da fertilização após o congelamento (CHAVEIRO et al., 2006). Os componentes essenciais dos meios de criopreservação são as substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela manutenção da osmolaridade e tamponamento, as fontes de lipoproteínas necessárias para a prevenção do choque frio, os crioprotetores como glicerol, etilenoglicol e DMSO, as fontes energéticas representadas por açúcares, como glicose e frutose, e os demais aditivos, tais como antibióticos, enzimas e detergentes (VISHWANATH e SHANNON, 2000).

A coleta de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo representa uma alternativa promissora quando por algum motivo não é possível obter gametas através da ejaculação (JONES, 2004) ou quando sua preservação seja de suma importância. Não há no mercado nacional e internacional atualmente um diluente específico para a criopreservação de espermatozoides do epidídimo, nem protocolos exclusivos para o congelamento, o que garantiria maior sucesso dessa biotecnologia, assegurando melhores resultados futuros. Nesse contexto, objetivou-se verificar o desempenho de dois diluentes comerciais existentes no mercado brasileiro para a criopreservação de sêmen convencional BotuBov[®] e Bovimix[®] sobre a viabilidade (movimento, morfologia e integridade de membranas plasmáticas e acrossomal) pós-descongelamento de espermatozoides colhidos do epidídimo de touros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizados 20 epidídimos obtidos por orquiectomia bilateral de 10 touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*), com peso médio de 560 kg e circunferência escrotal média de $36,2 \pm 3,2$ cm. Os animais foram mantidos em sistema extensivo de produção e o manejo alimentar foi através de pastejo em *Brachiaria sp.*, suplementação mineral e água a vontade. Anteriormente ao início do estudo os reprodutores foram avaliados clinicamente para comprovar o estado de higidez e eliminar qualquer comprometimento sanitário. Todos os touros foram considerados livres de brucelose e tuberculose. A orquiectomia bilateral foi realizada em tronco de contenção com o animal em estação através da aplicação de anestésico local (cloridato de lidocaína 2% com vasoconstrictor), 10 mL em cada cordão espermático e cinco mL na região da incisão. Uma incisão com aproximadamente cinco cm de comprimento foi feita na região lateral de cada testículo, seccionando-se a pele e túnica dartos e a túnica vaginal até exposição do testículo e da túnica albúlginea. Em seguida, o testículo foi tracionado e liberado do ligamento testicular, permitindo a manipulação do cordão espermático, no qual foi realizada a hemostasia e incisão final. O procedimento cirúrgico demorou em média $3,4 \pm 1,9$ minutos por testículo.

Após a orquiectomia, o material retirado foi levado até o laboratório para manipulação. Num primeiro momento, procedeu-se à lavagem do complexo testículo-epidídimo com solução de Ringer-lactato aquecida a 37°C para remoção de sujidades e vestígios de sangue. Utilizando-se pinças hemostáticas e bisturi, o epidídimo foi separado do testículo e, em seguida, a região da cauda e o ducto deferente foram

isolados do corpo e da cabeça do epidídimo para obtenção dos espermatozoides pela técnica de fluxo retrógrado (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006), com adaptações para a espécie bovina (BERTOL et al., 2012).

Após a colheita, as amostras obtidas de cada cauda epididimária, vinte ao todo, foram divididas em duas frações e centrifugadas a 600 X g por 10 minutos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, sendo o precipitado ressuspendido com os diluentes Botu-Bov[®] - BB (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) ou Bovimix[®] - BV (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil) (n=20). O envase foi feito em palhetas de 0,25 mL, lacradas com álcool polivinílico, numa concentração de 20×10^6 de espermatozoides com motilidade total por palheta, e cada palheta foi identificada com o tipo de diluente utilizado. Após esta etapa, as palhetas foram submetidas à refrigeração em container de transporte de sêmen Botu-tainer[®] (Biotech, Botucatu, SP, Brasil) para manutenção da temperatura em 5°C por período de equilíbrio de três horas.

Em seguida, procedeu-se à criopreservação em caixa isotérmica em vapor de nitrogênio líquido por um período de 20 minutos, através da alocação das palhetas em uma grade de metal posicionada seis cm acima da coluna de nitrogênio líquido. Após esse período, as palhetas foram imersas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) e, com auxílio de uma pinça hemostática, foram alojadas no compartimento superior e inferior de raques de metal, identificadas e transferidas para o botijão criogênico.

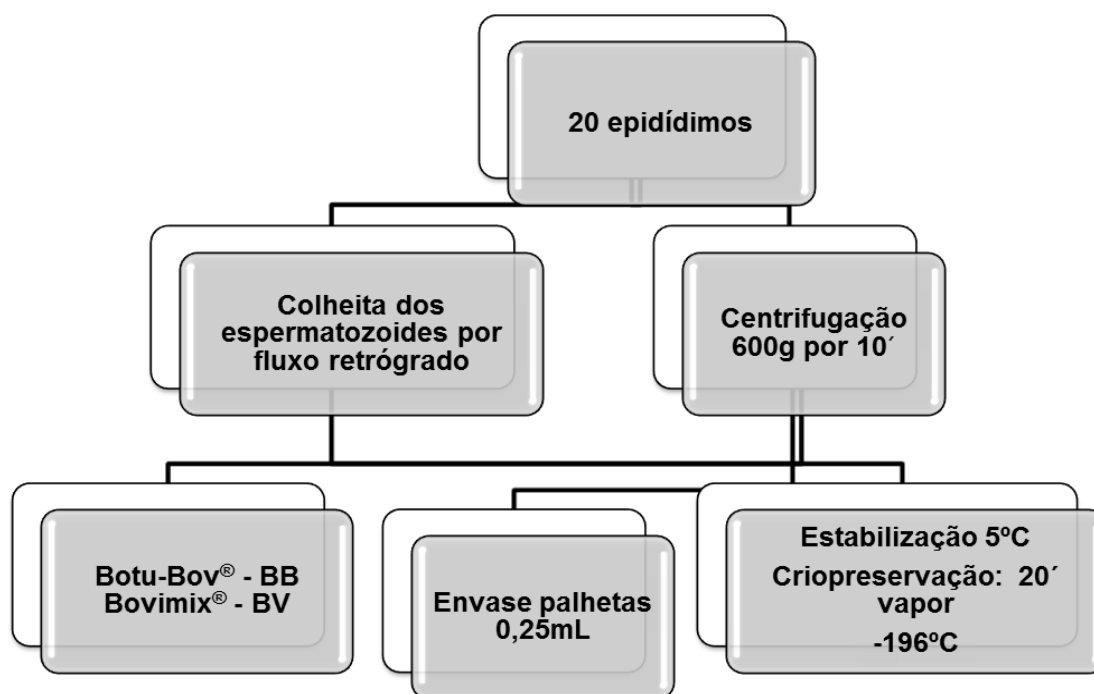


FIGURA 1- FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES.

Para a avaliação, 20 palhetas de cada grupo (BB e BV), sendo uma palheta de cada partida, totalizando 20 amostras por grupo, foram descongeladas em banho-maria a 40°C, por 20 segundos, e submetidas à análise computadorizada de movimento espermático - CASA (Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA - IVOS 12.3 – Hamilton Research - Beverly, MA, USA). Três campos foram selecionados ao acaso, observando-se os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, μms^{-1}); velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$); velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$); amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm); frequência de batimento espermático (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %); linearidade (LIN, %); e rapidez (RAP, %).

Os ajustes do setup utilizados para realização da leitura do aparelho foram: configuração de análise (RAM), captura de imagem (frames por segundo: 60 Hz, número de frames: 30), ceta de detecção (contraste mínimo: 60; tamanho celular mínimo: 5 pix), padrões se houver <5 células móveis (tamanho celular: 5pix, intensidade celular: 55). Células em progressão (velocidade de trajeto: VAP: $75\mu\text{ s}^{-1}$; lineariedade: STR: 80%), células lentas: células lentas estáticas (VAP limite de corte de $21,9\mu\text{ s}^{-1}$; VSL limite de corte de $6\mu\text{ s}^{-1}$). Canais estáticos: intensidade (mínimo 0,25; máximo 1,50), tamanho (mínimo 0,60; máximo 8,00), alongamento (mínimo 0; máximo 95). Calibração (ampliação: 1,95), fonte de vídeo (frequência: 60 Hz; campo: escuro), iluminação (intensidade: 2.400), fotômetro (baixo: 73, alto: 125). Câmara de análise (tipo: Makler; profundidade: $10.0\mu\text{ m}$; posição: 14,3 mm; seleção dos campos: automático; temperatura de análise: 37°C).

Uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação da morfologia espermática em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000 X em imersão através de preparações úmidas, classificando-se 200 células por preparação, de acordo com Blom (1973). Na análise dos dados, enfocaram-se espermatozoides com defeitos em acrossoma. Outro parâmetro avaliado neste estudo foi integridade total da membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides através do uso de sondas fluorescentes, diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP), de acordo com o método descrito por Harrison e Vickers (1990). As suspensões coradas foram depositadas entre lâmina e lamínula e observadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. Foram avaliadas 200 células por lâmina, e distribuídas em porcentagem (%) nas seguintes classificações: íntegros—acúmulo de DIC

(fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha); lesados—acúmulo de IP no núcleo celular, sem acúmulo de DIC ou acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal.

O total de espermatozoides com membranas íntegras (IMP) nas amostras foram classificados em dados percentuais. Os dados obtidos no experimento inicialmente foram submetidos ao Teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de Kruskal–Wallis, com o pós-teste de Dunn. A avaliação estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey–Kramer. Para as análises, utilizou-se nível de significância ($P < 0,05$). Para execução da estatística, usou-se o software StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As injúrias causadas pelos componentes do meio diluidor (crioprotetores) estão entre os principais estresses que a célula espermática sofre durante o processo de congelamento (VISHWANATH e SHANNON, 2000). Já está demonstrado que os diluentes de criopreservação de sêmen bovino, exercem influência significativa sobre os parâmetros de congelabilidade espermática, avaliados laboratorialmente (CRESPILO, 2007). A escolha do diluente ideal é essencial para minimizar os danos causados e manter a capacidade de fertilização dos espermatozoides após o processo de criopreservação.

Quando comparamos dois diluentes existentes no mercado nacional para sêmen de touro, na criopreservação de espermatozoides colhidos diretamente do epidídimo,

encontramos resultados próximos (TABELA 1). Não houve diferença na média de motilidade total e motilidade progressiva, quando congelados com BB ou BV.

Os valores de motilidade total encontrados estão inclusos nos valores aceitáveis para a utilização de sêmen congelado em inseminação artificial, e estiveram próximos aos relatados por outros autores na mesma espécie ao criopreservar espermatozoides do epidídimo (GOOVAERTS et al., 2006; PAPA et al., 2011). O movimento espermático representa uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de um espermatozoide, pois, com ausência de motilidade, a célula espermática é impossibilitada de realizar a migração no trato reprodutivo da fêmea até o encontro com o ovócito para a fecundação (LEMMA, 2012), sendo associado a casos de infertilidade.

Os valores de motilidade progressiva encontrados foram baixos quando comparados ao recomendado após descongelação uma amostra de sêmen convencional (CBRA, 2008). Isso se deve ao fato de que, quando os espermatozoides são colhidos do epidídimo, possuem número expressivo de gotas citoplasmáticas posicionadas na porção distal da cauda, provocando movimentação circular ao invés de progressiva. Em contrapartida, a quantidade de células em movimento é satisfatório em ambos os grupos, indicando a viabilidade dos espermatozoides em um dos principais parâmetros passíveis de avaliação *in vitro* para predição da fertilidade *in vivo*. Ainda na TABELA 1, são apresentados os demais parâmetros de movimentação espermática obtidos pela análise computadorizada. Em todos os parâmetros avaliados, não houve diferença entre os grupos BB e BV ($p > 0,05$).

TABELA 1 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DILUENTES COMERCIAIS BOTU-BOV® E BOVIMIX® PARA OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO): MT (%); MP (%); VAP (μms^{-1}); VSL (μms^{-1}); VCL (μms^{-1}); ALH (mm); BCF (Hz); STR (%); LIN (%) E RAP (%) DE ESPERMATOZOÍDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS PÓS-DESCONGELAÇÃO.

Parâmetro	Botu-bov® (n=20)	Bovimix® (n=20)
MT (%)	45,1±16,5 ^a	46,6±21 ^a
MP (%)	16,9±12,7 ^a	14,5±7,9 ^a
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	64,52±10,2 ^a	62,15±11,4 ^a
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	52,11±22,6 ^a	50,18±21,2 ^a
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	120,15±41 ^a	114,12±39,7 ^a
ALH (μm)	10,16±6,4 ^a	9,94±6,1 ^a
BCF (Hz)	33,56±11,6 ^a	32,01±11 ^a
STR (%)	62,3±10,4 ^a	63,2±10,1 ^a
LIN (%)	36±3,4 ^a	36,2±2,6 ^a
RAP (%)	22,8±11,8 ^a	22,1±12,7 ^a

MT - motilidade total (%); MP - motilidade progressiva (%); VAP - velocidade de trajeto (μms^{-1}); VSL - velocidade linear (μms^{-1}); VCL - velocidade curvilínea (μms^{-1}); ALH - deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF - frequência de batimento espermático (Hz); STR – retilinearidade (%); LIN – linearidade (%) e RAP - rápidos (%).

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,05$).

Os dois diluentes utilizados neste estudo possuem composição semelhante, ambos são à base Tris-gema de ovo, e crioprotetor glicerol, explicando resultados tão próximos. A constituição exata não é revelada em suas fórmulas, gerando a necessidade de serem testados individualmente.

Em um trabalho semelhante, são descritos resultados próximos, uma vez que também não houve diferença na análise computadorizada do sêmen entre o diluente

convencional TRIS e o Botu-bov[®] no congelamento de espermatozoides colhidos de epidídimos de touros (PAPA et al., 2011). Com isso, pode-se afirmar que, é eficiente utilizar diluente para congelamento de sêmen convencional de touro no congelamento de espermatozoides do epidídimo, e os resultados não variam entre algumas fórmulas existentes no mercado. Isso significa que a composição de macro e micro elementos é capaz de suprir as necessidades básicas de proteção e manutenção das células espermáticas.

Por outro lado, em espécie diferente, MARTINS et al. (2012) viabilizaram a utilização do diluente nacional Bovimix[®] e do TRIS para a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de cão e obtiveram melhores resultados com a utilização do Bovimix[®] em relação ao TRIS na maioria dos parâmetros avaliados no CASA. A média \pm desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas (TABELA 2) pós-descongelamento não diferiram ($p>0,05$). A maior ocorrência de alteração morfológica foi composta pela presença de gotas citoplasmáticas distais, um defeito menor e característico dos espermatozoides colhidos diretamente da cauda do epidídimo (MARTINS et al., 2007; COSTA et al., 2011). A quantidade de células espermáticas com acrossomas lesados (DA) foi baixa e similar para os dois diluentes (BB e BV), demonstrando que a alternância do meio diluidor não foi impactante nesse parâmetro assim como nos demais.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi semelhante entre os diluentes BB e BV (TABELA 2), e ambos os meios foram capazes de conservar mais de 50% de espermatozoides com membranas íntegras pós-descongelamento. A resistência das membranas ao processo de criopreservação é um bom indicativo de

viabilidade, pois são estruturas especializadas que exercem funções fundamentais na fecundação (ARRUDA et al., 2010). Os valores encontrados da porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana foram semelhantes aos descritos por COSTA et al. (2011).

TABELA 2 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DILUENTES COMERCIAIS BOTU-BOV[®] E BOVIMIX[®] (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) PARA A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA, DEFEITOS DE ACROSSOMA E INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOÍDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS.

Diluyente (n=20)	EMD (%)		DA (%)	IMP (%)
	Defeitos maiores	Defeitos menores		
Botu-bov [®]	11,1 \pm 0,2	32,8 \pm 4,7 ^a	9,6 \pm 1 ^a	51,2 \pm 13,5 ^a
Bovimix [®]	10,3 \pm 0,6	30,5 \pm 5 ^a	9,2 \pm 1,2 ^a	57,3 \pm 13,4 ^a

Espermatozoides morfológicamente deformados (EMD, %); defeitos de acrossoma, (DA, %) e integridade de membrana plasmática (IMP, %).

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (P>0,05).

Os estudos em criopreservação e fertilidade de espermatozoides do epidídimo de touros são escassos, indicando a necessidade de novos trabalhos para gerar dados para comparação e referência na utilização desse material biológico. Aliando-se a análise computadorizada de movimento espermático, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática, que são atualmente algumas das técnicas mais modernas disponíveis para avaliação espermática, pode-se estimar o potencial de fertilização dos espermatozoides após criopreservação com Botu-bov[®] e Bovimix[®], uma vez que células espermáticas que apresentem bons resultados nesses testes provavelmente irão apresentar um bom desempenho em fertilização de oócitos e, em consequência, tornar possível o resgate de informação genética. Como teste final de fertilidade recomenda-se a utilização das doses criopreservadas de espermatozoides do epidídimo na produção *in vitro* de embriões e na inseminação artificial.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os diluentes nacionais comerciais Botu-Bov[®] e Bovimix[®] constituem opções viáveis para a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros, não apresentando diferença significativa entre si na viabilidade espermática (movimento, morfologia e integridade de membrana plasmática e acrossomal) pós-descongelamento.

5. REFERENCIAS

ARRUDA, R.L. et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 34, p. 168-184, 2010.

BERTOL, M.A.F. **Viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Animal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, PR.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CHAVEIRO, A. et al. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. **Theriogenology**, v. 65, p. 1875-1890, 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. 1998. 49p.

COSTA, P.M. et al. Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine. **Ciência Rural**, v. 4, p. 869-874, 2011.

CRESPILHO, A.M. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF)**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, SP.

HARRISON, R.A.P. e VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

GOOVAERTS, I.G. et al. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 15, p. 323-30, 2006.

JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. **Biology of Reproduction**, v. 7, p. 1405-1411, 2004.

KAABI, M. et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1249-1259, 2003.

LEMMA, A. **Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility**. In: MANAFI, M. Artificial insemination in farm animals. Croatia: InTech, 2011. Cap. 12, p. 191-216, 2012.

MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Comparasion of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471-485, 2006.

MARTINS C.F. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326-331, 2007.

MARTINS, M.I.M. et al. Comparison of two different extenders for cryopreservation of epididymal dog sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 293-294, 2012.

PAPA, M.P. et al. Influence of two different extenders on cryopreservation of bovine epididymal sperm. Águas de São Pedro, SP. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE EPIDIDYMIS, 5., 2010. Anais... **Animal Reproduction**, v. 8, n.3 - 4, p. 104, 2011.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481- 492, 2000.

VERBERCKMOES, S. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 912-922, 2005.

CAPÍTULO IV

POTENCIAL DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS ATÉ 30 HORAS EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C)

In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 to 20°C)

Running title: FERTILIZATION OF CRYOPRESERVED EPIDIDYMAL BULL SPERM

Melina Andrea Formighieri Bertol^{9*}, Romildo Romualdo Weiss⁹, Luiz Ernandes Kozicki¹⁰,
Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu¹¹, João Filipi Scheffer Pereira¹⁰, Jonathan
Jesus da Silva¹⁰

(Aceito para publicação na Revista Theriogenology, Elsevier)

⁹ Departamento de Tecnologia, Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Saúde Humana e Animal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

¹⁰ Departamento de Medicina Veterinária, Pós-graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

¹¹ Médica Veterinária autônoma.

*Autor para correspondência: melbertol@hotmail.com

RESUMO

Os objetivos desse estudo foram: criopreservar espermatozoides obtidos de epidídimos bovinos (EP) mantidos em temperatura de 18-20°C por diferentes períodos pós-orquiectomia de 6, 12, 18, 24 e 30 horas, avaliar a viabilidade pós-descongelamento, o potencial de fertilização através da produção *in vitro* de embriões (PIVE) comparando os resultados com os do sêmen colhido por eletroejaculação (EJ) dos mesmos touros e utilizar doses descongeladas de G30 na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de novilhas zebuínas. Além disso, determinar os fatores tem influência nos resultados de viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. Amostras de sêmen de 10 touros Tabapuã foram colhidas por eletroejaculação para criopreservação. Uma semana depois, os animais foram submetidos à orquiectomia e os 20 epidídimos, acondicionados em temperatura ambiente até a recuperação dos espermatozoides por fluxo retrógrado. Em seguida, realizou-se a criopreservação, e os parâmetros pós-descongelamento de movimento e morfologia espermática foram determinados no CASA (*computer assisted sperm analysis*) por análises microscópicas. Os espermatozoides foram utilizados para fecundação *in vitro* de oócitos obtidos em abatedouro e na inseminação artificial de novilhas. Foi determinada a taxa de clivagem, taxa de blastocisto, eclosão e contagem total do número de células embrionárias após cultivo *in vitro*. Na avaliação da viabilidade espermática pós-descongelamento, os parâmetros motilidade total, progressiva e integridade de membrana plasmática foram baixos ($p < 0,05$) para os espermatozoides recuperados após 30 horas. Na PIVE, foi possível obter blastocistos em todos os grupos, porém a taxa de produção embrionária variou de 27,2 a 32,2% nos grupos com os tempos de exposição à temperatura ambiente de 6, 12 e 18h, melhor ($p < 0,05$) que os demais. O número de blastocistos (D7 e D8), e a taxa de eclosão foram menores no G24 e no G30, em relação aos demais. Os embriões em G6EP possuem maior número de células ($p < 0,05$), em média 280,5 células por embrião. Com indução farmacológica da ovulação em novilhas, obteve-se uma gestação após inseminação com espermatozoides do epidídimo com 5,2% de motilidade progressiva pós-descongelamento (G30). Os fatores que mais influenciaram na viabilidade pós-descongelamento e na capacidade de fertilização dos espermatozoides, foram: tempo pós-orquiectomia, temperatura de manutenção dos epidídimos e variações individuais. A origem do sêmen EJ versus EP foi menos importante na variabilidade dos resultados. Pela primeira vez foi possível produzir embriões *in vitro* até oito dias de desenvolvimento e uma gestação após IATF com espermatozoides do epidídimo de touros, quando mantidos em temperatura ambiente (18-20°C).

Palavras-chave: criopreservação, espermatozoides, epidídimo, fertilização *in vitro*, embrião

ABSTRACT

The aims of this study were to compare the viability and *in vivo* and *in vitro* fertilization potential post-thaw of sperm collected at different times post-orchietomy from bull epididymides at 18 to 20°C, with those of semen collected by electroejaculation (EJ) from the same bulls. Semen samples (EJ) were collected from ten Zebu bulls and cryopreserved. A week later twenty epididymides from these bulls were obtained by orchietomy and randomly divided into five groups (G) to be maintained at ambient temperature for 6, 12, 18, 24 and 30 h before sperm recovery by retrograde flow. The sperm were cryopreserved and after thawing parameters were determined by both computer assisted sperm analysis and morphological analysis. *In vitro* fertilization of oocytes was performed to assess the cleavage rate, blastocyst rate, total number of cells and hatching rate of embryos. The G30 sperm samples were also used for fixed time artificial insemination (FTAI) of Zebu heifers (n=10). The results of post-thaw sperm viability showed that total and progressive motility and plasma membrane integrity were lower in sperm in which cryopreservation was delayed for 30 h, showing a negative correlation of these parameters with delay before cryopreservation. In all groups it was possible to obtain viable embryos, and embryos from G6 samples had more cells than the other groups. The embryo production rate and hatching rate were significantly lower in G24 and G30 samples. For EJ many individual variations were observed in embryo production potential between bulls. G30 samples, with only 5.2% of post-thaw progressive motility, it was able to fertilize *in vivo* with FTAI. To the authors' knowledge, this is the first time *in vitro* embryos up to eight days of development and a pregnancy after FTAI have been produced with sperm from bull epididymides that had been stored at 18 to 20°C for up to 30 hours.

Keywords: cryopreservation, sperm, epididymis, *in vitro* fertilization, embryo

1. INTRODUÇÃO

A recuperação, preservação e utilização de espermatozoides provenientes da reserva epididimária, são procedimentos fundamentais para a manutenção de material genético de animais valiosos (BERTOL et al., 2013), domésticos (CHATDARONG et al., 2010) ou selvagens (FERNANDEZ-SANTOS et al., 2007) em condições adversas (KAABI et al., 2003) e também como fonte alternativa de gametas em casos de infertilidade no homem (CHEN et al., 1998; DROUINEAUD, et al., 2003). Há trabalhos com recuperação de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo de bovinos (IGBOELI e FOOTE, 1968; TURRI et al., 2012), porém na maioria dos casos, os gametas são recuperados imediatamente após o abate ou orquiectomia, ou mantidos em epidídimos refrigerados a 5°C por longos períodos (MARTINS et al., 2009; LOPES et al., 2015) e poucos estudos foram feitos com a manutenção das estruturas em temperatura ambiente antes da colheita dos espermatozoides.

Para a preservação por longo prazo do material genético de reprodutores valiosos o método mais eficaz é a criopreservação. Os protocolos, bem como os diluentes utilizados para criopreservação de sêmen convencional de bovinos estão definidos, ao contrário do que acontece para espermatozoides provenientes diretamente do epidídimo. Esses possuem particularidades, como a ausência de plasma seminal e grande quantidade de gotas citoplasmáticas mediais e distais, que tornam sua manipulação singular, tanto para a criopreservação quanto para a fertilização *in vitro* (MARTINS et al., 2009; CARREIRA et al., 2012). Apesar de representar prática recente, a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de

touros utilizando diluentes que possuem em sua fórmula Tris, gema de ovo, glicerol e ácido cítrico já foi descrita por alguns autores (MARTINS et al., 2007; ANSARI et al., 2010; TURRI et al., 2012; BERTOL et al., 2014; LOPES et al., 2015).

Após a criopreservação, os gametas podem ser utilizados em biotecnologias como a inseminação artificial e a fecundação *in vitro* de oócitos. A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia indispensável na massificação da propagação de material genético, pois o número de embriões produzidos é muito superior ao produzido *in vivo*. Além disso, permitir a utilização de fêmeas sub-férteis, com alto valor genético, alta produção zootécnica, com diferentes idades, condições reprodutivas ou até mesmo após a morte (GALLI e LAZZARI, 1996). Embora demonstrado por Martins et al. (2009) de que há possibilidade de utilizar técnicas *in vitro* para produzir embriões bovinos a partir de espermatozoides criopreservados de epidídimos armazenadas por várias horas à 5°C, ainda não há relatos na literatura sobre o potencial de fertilização de gametas recuperados de epidídimos mantidos em temperatura ambiente.

Nesse contexto, os objetivos desse estudo foram criopreservar e avaliar a viabilidade pós-descongelamento de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de touros zebuínos, quando mantidos por até 30 horas em temperatura de 18 à 20°C e determinar seu potencial de fertilização *in vitro* através da produção *in vitro* de embriões e *in vivo* na inseminação artificial em tempo fixo de novilhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo, a utilização dos animais experimentais foi fundamentada em diretrizes da comissão de ética no uso de animais CEUASCA/UFPR, protocolo

nº017/2013, e para as técnicas *in vitro* pelo comitê de ética no uso de animais CEUA/PUCPR, protocolo nº 894/2014.

2.1 Seleção dos animais e amostras do ejaculado (EJ)

Foram selecionados através de exame clínico geral e exame andrológico touros zebuínos (*Bos taurus indicus*) puros de origem da raça Tabapuã (n=10) saudáveis, negativos para Brucelose e Tuberculose e livres de qualquer sinal aparente de doença que compromettesse seu estado de higidez. Os touros com $63,1 \pm 23$ meses de idade, com peso médio de $560 \pm 100,3$ Kg e escore de condição corporal igual a $4 \pm 0,5$, pertenciam à fazenda (latitude 25°37'0.4.4''sul, longitude 52°48'58.9'' oeste e altitude de 505 m) de seleção de reprodutores Puros de Origem (P.O.). Durante o estudo, na primavera, foram mantidos extensivamente em piquetes com capim estrela (*Cynodon spp.*) e *Brachiaria sp.*, além de suplementação mineral¹² e água *ad libitum*. Para obter as amostras do ejaculado (EJ) utilizou-se a eletroejaculação¹³, pois os touros não estavam condicionados a outra técnica de colheita de sêmen. O aparelho de eletroejaculação foi introduzido no reto dos touros devidamente contidos e, aplicou-se sucessivos estímulos elétricos de zero até 780 mA, durante três segundos com três segundos de intervalo até a emissão do ejaculado em um tubo graduado. Durante o procedimento evitou-se desconforto desnecessários aos animais preconizando-se o bem-estar animal. As amostras de sêmen foram avaliadas subjetivamente em microscópio ótico pela observação da motilidade total (0 a 100%), vigor (1 a 5),

¹² FOSBOVI 30, Tortuga, São Paulo, Brasil.

¹³ TK 800, TK equipamentos para reprodução, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

concentração, através da contagem do número total de espermatozoides em câmara de Neubauer e morfologia, pela classificação dos espermatozoides corados por vermelho Congo.

2.2 Obtenção dos testículos e dos espermatozoides do epidídimo (EP)

Uma semana após obtenção do ejaculado realizou-se a orquiectomia bilateral de todos os reprodutores mediante contenção adequada e aplicação de anestesia local no cordão espermático e na linha da incisão com lidocaína 2% sem vasoconstritor¹⁴. Após incisão da pele, tecido conjuntivo e as demais camadas associando-se a homeostasia dos vasos e dos cordões espermáticos, os testículos e epidídimos foram imediatamente transportados até o laboratório equipado na própria fazenda, e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=4), correspondente ao período de 6, 12, 18, 24 e 30 horas (G6; G12; G18, G24, G30) de permanência em temperatura controlada de 18 a 20°C. Essa temperatura foi escolhida por se aproximar da temperatura ambiente anual média na região onde foi realizado o estudo. A técnica de fluxo retrógrado (GARDE et al., 1994; MARTINEZ-PASTOR et al., 2006) foi utilizada para recuperação dos espermatozoides, através da perfusão de 20 mL da solução final formada por 20 mL de água destilada para cada 100 mL do meio a base de leite desnatado aquecidos à 37°C, em cada cauda do epidídimo. Logo após a colheita os espermatozoides e antes da criopreservação os espermatozoides foram avaliados da mesma forma descrita em 2.1 para os parâmetros de motilidade, vigor, concentração e morfologia (BERTOL et al.,

¹⁴ Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

2013). Após avaliação, as amostras (gametas mais meio de recuperação¹⁵) foram centrifugadas a 600 X g por 10 minutos para separação do diluente de lavagem e outros contaminantes, e adição do diluente de criopreservação.

2.3 Criopreservação

Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento adicionado ao diluente Botu-bov®¹⁶ constituído por TRIS-gema de ovo, e 7% de glicerol. Após a diluição, foi realizada nova avaliação subjetiva dos padrões de movimentação, vigor e a contagem do número total de células, para verificar os efeitos da centrifugação e da adaptação ao diluente. Em seguida, os espermatozoides foram envasados com concentração de 20 milhões de células viáveis por palheta de 0,25 mL previamente identificadas conforme o reprodutor e o grupo. As palhetas foram lacradas com álcool polivilínico. Para estabilização da temperatura, as doses foram mantidas por três horas em um container¹⁷ de refrigeração de sêmen (5°C), e em seguida, posicionadas horizontalmente em um suporte elevado a seis cm de altura em caixa de poliestireno expandido contendo N₂ líquido, por 20 minutos, para que ocorresse o congelamento em vapor nitrogênio (N₂), antes da imersão diretamente no N₂ líquido (-196°C). Foram criopreservadas 40 doses por touro de cada grupo, e alojadas no botijão criogênico para estoque até utilização dos gametas.

¹⁵ Botu-turbo®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil

¹⁶ Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Botu-tainer®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil

2.4 Avaliação espermática

A análise computadorizada de sêmen —CASA— (aparelho *Hamilton Thorn Motility Analyser* - HTMA - IVOS 12.3) foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp (Botucatu).

Duas palhetas de cada partida de todos os grupos foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos e depositadas no interior do aparelho para análise computadorizada de sêmen. Foram selecionados três campos ao acaso, observando-se os seguintes parâmetros: motilidade total (MT,%); motilidade progressiva (MP,%); velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}^{-1}$); velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}^{-1}$); velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}^{-1}$); amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm); frequência de batimento espermático (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %); linearidade (LIN, %); e rápidos (RAP, %). Para comparação entre os grupos foram escolhidos os três principais parâmetros de movimentação espermática, a motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos.

O número de espermatozoides com defeitos morfológicos foi determinado após contagem e classificação de 200 células em microscopia de contraste de fase através de preparações úmidas, e a integridade de membrana plasmática através das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP), de acordo com o método descrito por Harrison e Vickers (1990).

2.5 Fertilização *in vivo*

Para estabelecer o potencial de fertilização *in vivo* dos espermatozoides do epidídimo, 10 novilhas da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) foram sincronizadas para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). As novilhas com 36 ± 6 meses de idade, escore de condição corporal 3,5 foram mantidas em pastagens formadas principalmente por *Brachiaria sp.*, sal mineral e água *ad libitum*. Em relação ao *status* reprodutivo, foi feita avaliação ultrassonográfica dos ovários e útero para determinação de ciclicidade, ou seja, as fêmeas deveriam apresentar ovário com comprimento aproximado e presença de corpo lúteo. Fêmeas cíclicas foram priorizadas no estudo. O protocolo de sincronização de cio utilizado (FIGURA 1) foi: 2 mg de benzoato de estradiol e implante intravaginal (uma utilização) impregnado com 1 g de progesterona no D0; 150 µg de D-cloprostenol, 1 mg de cipionato de estradiol, e 300 UI de eCG¹⁸ na retirada do implante no D8, sendo a IATF realizada 50 horas depois. Os hormônios, com exceção do eCG, foram obtidos da empresa Biogenesis Bagó (Argentina). Devido à baixa disponibilidade de fêmeas para protocolo, optou-se por utilizar os espermatozoides do grupo com maior número de horas de permanência no epidídimo antes da colheita (G30), com menor valor de motilidade total e progressiva pós-descongelação comparado aos demais, estimando-se menor capacidade de fertilização. O diagnóstico de prenhez foi realizado com 33 dias pós-inseminação através de ultrassonografia¹⁹ transretal.

¹⁸ Novormon, Syntex, Argentina

¹⁹ US Carewell CUS-3000V, China

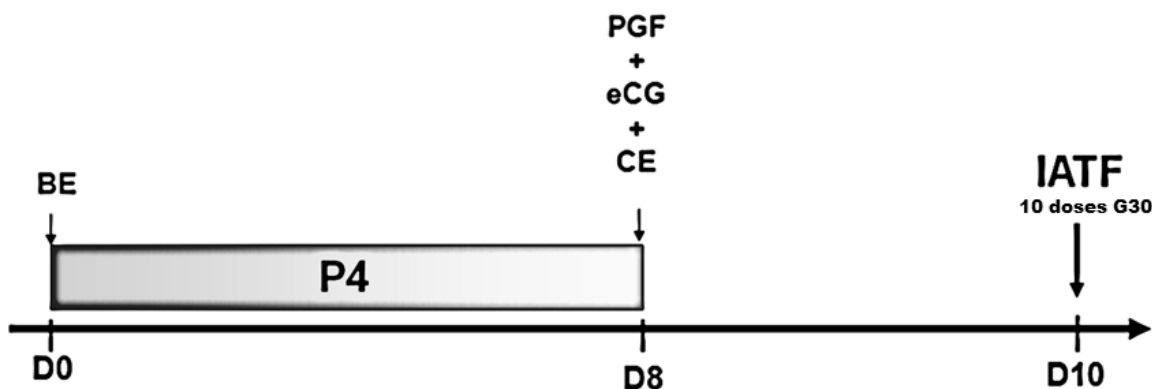


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO HORMONAL UTILIZADO PARA SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM NOVILHAS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*). BE, BENZOATO DE ESTRADIOL (BIOESTROGEN, BIOGENESIS BAGÓ); PGF, PROSTAGLANDINA F2ALFA (CRONIBEM, BIOGENESIS BAGÓ); CE, CIPIONATO DE ESTRADIOL (CRONI-CIP, BIOGENESIS BAGÓ), P4, IMPLANTE INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (CRONIPRESS MONODOSE, BIOGENESIS BAGÓ), ECG, GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (NOVORMON, SYNTEX, ARGENTINA), NO DIA 0 (D0), DIA 8 (D8) E NO DIA 10 (D10).

2.6 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

No presente estudo, a fertilização *in vitro* foi utilizada para determinar a capacidade de fertilização dos espermatozoides da reserva epididimária, e obtenção de embriões viáveis. Para esse propósito, somente um touro por grupo (6, 12, 18, 24 e 30 horas) foi escolhido para o teste *in vitro* após avaliação individual da maior motilidade espermática pós-descongelamento. Além disso, as amostras de sêmen colhidas por eletroejaculação (EJ) dos mesmos touros selecionados foram utilizadas como grupo controle em todas as rotinas *in vitro*. Todas as etapas da produção *in vitro* de embriões foram realizadas no Laboratório experimental de Cultivo Celular – Núcleo de terapia celular /PUCPR.

2.6.1 Colheita e maturação *in vitro* dos oócitos

Os ovários foram obtidos logo após o abate de fêmeas bovinas sem raça definida, em fase desconhecida do ciclo estral em abatedouro da região metropolitana de Curitiba, Paraná. O transporte até o laboratório foi feito em recipiente térmico contendo solução fisiológica na temperatura de 35°C. Num período máximo de cinco horas, todos os folículos antrais médios de três a oito mm de diâmetro foram aspirados manualmente com seringa de cinco mL e agulha hipodérmica para obtenção do líquido folicular e complexos cúmulos-oócitos (CCOs).



FIGURA 2 – A: OVÁRIO BOVINO OBTIDO EM ABATEDOURO; B: ASPIRAÇÃO MANUAL DE FOLÍCULOS ANTRAIS ENTRE 3 E 8 MM DE DIÂMETRO; C: LÍQUIDO FOLICULAR CONTENDO OÓCITOS, DEPOSITADO EM PLACA DE PETRI ESTÉRIL.

FONTE: O AUTOR (2015).

Após aspiração, os oócitos e o líquido folicular foram transferidos para placas de petri estéreis para seleção, em estereomicroscópio, através da avaliação das características das células do cumulus (ausência, presença e número de camadas) e a homogeneidade do ooplasma. Classificados segundo Stojkovic et al. (2001), somente os oócitos com boa qualidade (categorias 1 e 2) foram utilizados na etapa seguinte. Os

oócitos selecionados foram transferidos para placas de petri de 35 mm de diâmetro tratadas e preparadas com sete gotas de 80 µL acomodadas sob óleo mineral neutro, com grupos de 25 a 30 oócitos por gota. Foi realizado mais de um procedimento de produção *in vitro* por grupo e em todas as rotinas, foram utilizados no total 1.641 oócitos. Para a maturação *in vitro* dos oócitos foi utilizado meio TCM 199 (Sigma-Aldrich, USA) contendo 0,06849 mM/mL de glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato 22 µg/mL, hormônio folículo estimulante (FSH) 0,5 µg/mL, hormônio luteinizante (LH) 10 UI/mL, estradiol 1 µg/mL e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL por 24 horas em incubadora de CO₂ (5%) em ar, com temperatura de 38,7°C.

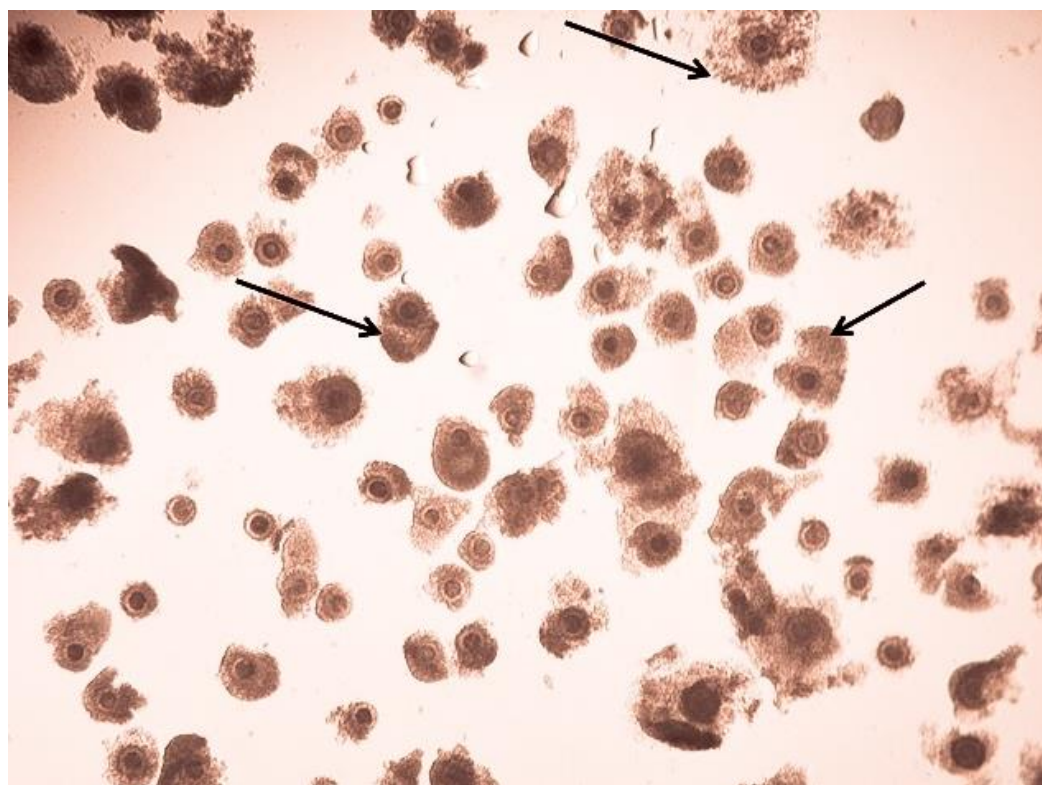


FIGURA 3 – IMAGEM EM ESTEREOMICROSCOPIO (120X) DE OÓCITOS BOVINOS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR, COM COMPLEXO CUMULUS-OÓCITOS (COC) EM DESTAQUE.

FONTE: O AUTOR (2015).

2.6.2 Seleção espermática e fertilização *in vitro*

Para determinação das doses a serem utilizadas na fertilização *in vitro*, foram escolhidos os reprodutores de cada grupo com os melhores parâmetros após análise computadorizada de movimentação espermática, principalmente motilidade progressiva, pós-descongelamento. As doses selecionadas foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos.

Em seguida, devido ao elevado número de gotas citoplasmáticas mediais e distais na cauda dos espermatozoides, foram testados três tempos (0, 5 e 20 minutos) de permanência, em banho-maria a 30°C para liberação espontânea das gotas (BARTH e OKO, 1989). Após a permanência das amostras nos três tempos, e seleção espermática através do gradiente de seleção Bovipure²⁰ em duas frações, realizou-se centrifugação a 880 X g de força por 12 minutos. Após ressuspensão do pellet com meio próprio FIV, uma alíquota foi depositada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37°C) para análise subjetiva da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva em microscópio ótico em aumento de 40 X. Dos três tempos testados, o que resultou na maior quantidade de espermatozoides com motilidade progressiva, e em consequência seleção mais eficiente, foi o tempo de 20 minutos, estabelecendo-se o protocolo a ser usado nas análises definitivas.

Desta forma, as amostras de cada grupo (G6, G12, G18, G24 e G30) do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) foram descongeladas por 30 segundos à 35°C e posteriormente mantidas por 20 minutos em banho-maria à 30°C. Em seguida,

²⁰ Nidacon International AB

transferidas para microtubos de polipropileno²¹ contendo 400 µL de Bovipure e 400 µL de Bovipure e Sperm-TALP na proporção de 1:1 formando gradiente de seleção espermática com duas frações (100 e 50%). Utilizou-se centrifugação a 880 X g de força por 12 minutos. Após centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, e o pellet foi aspirado com micropipeta e diluído em meio próprio FIV contendo Fert-TALP, adicionado de 0,6 g/mL de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF), piruvato 22 µg/mL, PHE 440 µg/mL, heparina 10 UI/mL e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL.

Os espermatozoides diluídos foram avaliados em microscópio ótico (40 X) em lâmina sob lamínula pré-aquecidas a 37°C, para determinar a motilidade, sendo considerado satisfatório quando superior a 50%. Após avaliação, a solução contendo meio FIV e concentração mínima de 1×10^6 espermatozoides/mL (diluição padrão) foi transferida para cada gota contendo 25 oócitos já maturados. Os espermatozoides de EP e EJ permaneceram em incubação com os oócitos por 22 horas para que ocorresse a fertilização, nas mesmas condições citadas anteriormente na seção 2.6.1.

2.6.3 Cultivo *in vitro* (CIV) e avaliação dos embriões

Após fertilização os zigotos de cada grupo foram lavados e transferidos para as gotas contendo meio CR2, suplementado com 0,5 g/L de BSA-FAF, 5% de SFB, 0,00034 mM/mL de glutamina, 0,1 mM/mL de alanina e 0,1mM/mL de glicina e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL e mantidos em incubadora de CO₂ (5%) em ar, com

²¹ Eppendorf®

temperatura de 38,7°C por oito dias. Durante o cultivo os embriões foram avaliados no dia três (D3) pós-fertilização para determinação da taxa de clivagem, no dia sete (D7) para contagem do número de blastocistos e no dia oito (D8) para determinar a taxa acumulada de blastocistos (produção total de blastocistos) e a taxa de eclosão embrionária, em relação aos blastocistos visualizados no dia sete.

Os embriões eclodidos no dia oito foram destinados à contagem total de células (CTC). Para isso, foram transferidos para solução contendo TBS-Triton 1 X em gota de 100 µL por cinco minutos e, posteriormente, depositados em gota de 60 µL de corante DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol)²², na concentração de 1µL/mL por 10 minutos. Depois foram acondicionados entre lâminas e lamínulas contendo 10 µL de glicerol (Sigma-Aldrich, USA). Para avaliação utilizou-se microscópio de epifluorescência²³ com captura das imagens pelo software LAS-AF®, software próprio para análise de imagens geradas por microscopia. De forma objetiva, pela avaliação individual dos núcleos celulares, o número total de células de cada embrião foi computado.

²² Sigma-Aldrich, USA

²³ LEICA DM4000, Alemanha.

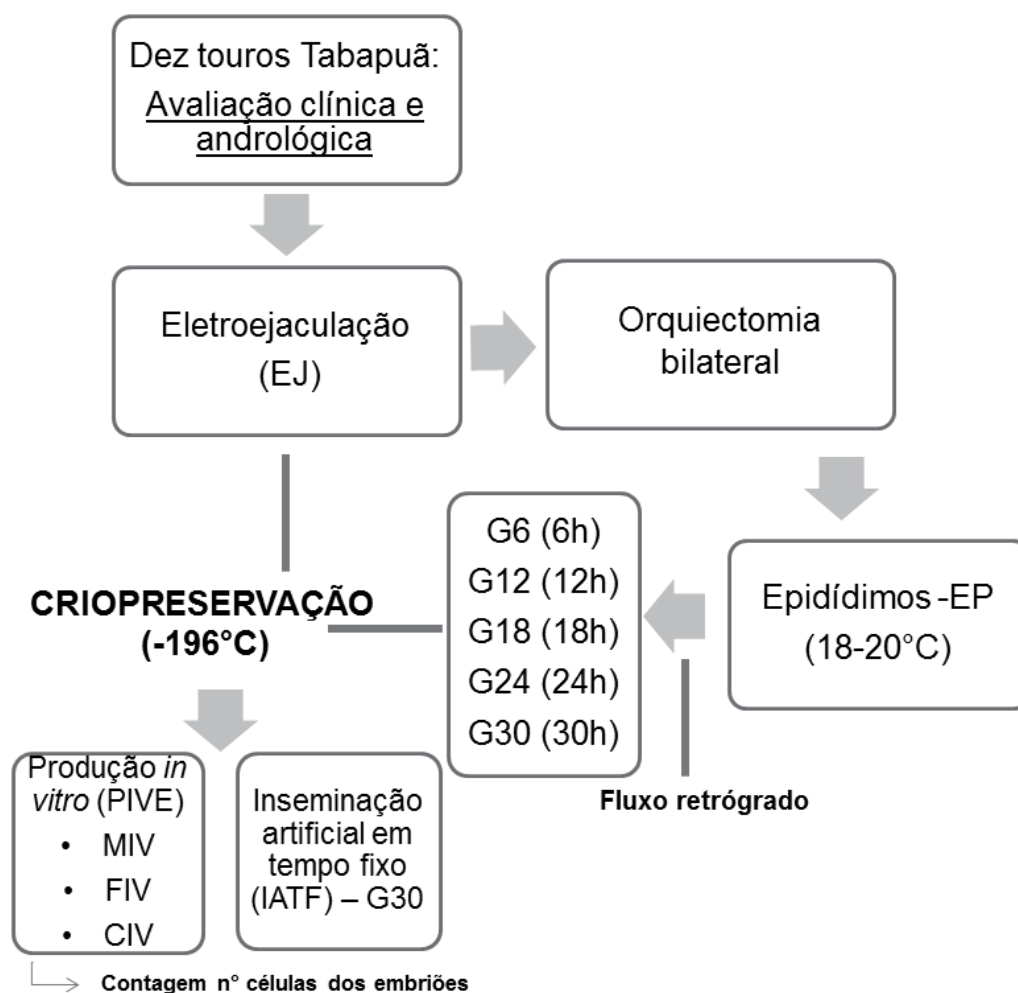


FIGURA 4. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA O TESTE DE FERTILIDADE. OS ESPERMATOZOÍDAS CRIOPRESERVADOS DO EPIDÍDIMO FORAM UTILIZADOS PARA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OBTIDOS EM ABATEDOUROS E NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE NOVILHAS.

2.7 Análise estatística

Os dados de viabilidade espermática foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os que não seguiram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal–Wallis, com o pós-teste de Dunn. Os resultados de viabilidade espermática e de produção *in vitro* de embriões com distribuição normal foram determinados

aplicando-se a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Quando não houve homogeneidade de variância, os dados foram transformados para r^2 e para todas as análises, admitiu-se nível de significância ($p < 0,05$). Para execução da estatística, foram utilizados os softwares JMP v.15 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e o Statgraphics® Centurion XVI.

3. RESULTADOS

Os dados obtidos pós-descongelamento dos espermatozoides do epidídimo de touros em diferentes períodos de tempo (TABELA 1) indicam que a motilidade total reduziu com o aumento do tempo pós-orquiectomia, sendo a motilidade em G30 menor que em G18 e G6 ($p < 0,05$). Da mesma forma, a movimentação progressiva também foi influenciada pelo tempo de colheita, sendo que espermatozoides que permaneceram por 30 horas na cauda do epidídimo tiveram menor valor médio pós-descongelamento desse parâmetro. Os outros parâmetros da movimentação espermática como VSL, ALH, BCF, STR e LIN não diferiram entre todos os grupos ($p > 0,05$). Quando se avaliou os espermatozoides com movimentação rápida (RAP) foi observado que o G30 e o EJ apresentaram valores inferiores ao G18 ($p < 0,05$) e semelhante aos demais.

TABELA 1- MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DOS DADOS OBTIDOS POR *COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS* (CASA) E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZOIDES PÓS-DESCONGELAMENTO COLHIDOS POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-ORQUIECTOMIA (6, 12, 18, 24 E 30 HORAS).

	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	EMD (%)	DA (%)	IMP (%)
EJ	38,7 \pm 24,8 ^{ab}	12,8 \pm 11,1 ^a	19,2 \pm 15,8 ^a	26,1 \pm 7,6 ^a	12,8 \pm 4,5 ^a	27,2 \pm 10,5 ^a
G6	56 \pm 9,4 ^a	17,5 \pm 4,7 ^{ab}	22,7 \pm 5,5 ^{ab}	45 \pm 6 ^b	10,2 \pm 0,9 ^{ab}	59,5 \pm 7 ^b
G12	42,2 \pm 18,3 ^{ab}	13 \pm 5,8 ^{ab}	20,5 \pm 11,1 ^{ab}	43 \pm 7,7 ^b	9,5 \pm 1,2 ^{ab}	63,7 \pm 9,7 ^b
G18	61 \pm 12,4 ^a	23,7 \pm 9,3 ^b	35,5 \pm 13,2 ^b	42,2 \pm 2,2 ^b	8 \pm 0,8 ^b	56 \pm 11,2 ^b
G24	51,2 \pm 13,3 ^{ab}	15 \pm 2,5 ^{ab}	24,2 \pm 7,3 ^{ab}	44,5 \pm 1,9 ^b	9,2 \pm 0,5 ^{ab}	59,75 \pm 3,6 ^b
G30	22,7 \pm 12,1 ^b	5,2 \pm 3,3 ^a	9,25 \pm 7,1 ^a	42 \pm 5,4 ^b	10 \pm 0,8 ^{ab}	32,2 \pm 4,9 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$). MT= motilidade total; MP=motilidade progressiva; RAP=espermatozoides rápidos; EMD=espermatozoides morfologicamente deformados; DA= defeitos de acrossoma; IMP= Porcentagem de membranas plasmáticas íntegras.

Na TABELA 1, em relação à morfologia espermática, a alta quantidade de alterações morfológicas se deve principalmente a presença de gotas citoplasmáticas mediais e distais. Na avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP), observou-se que os espermatozoides do epidídimo possuem mais células com membrana íntegra após o congelamento do que os espermatozoides colhidos por eletroejaculação, exceto o G30, que foi semelhante ao EJ, com maior número de espermatozoides com rompimento de membrana.

Os dados da produção de embriões *in vitro* com espermatozoides colhidos por eletroejaculação (EJ) e diretamente da cauda do epidídimo (EP) em diferentes períodos pós-orquiectomia (6, 12, 18, 24 e 30 horas) dos mesmos touros (TABELA 2), são representados pela taxa (%) de clivagem (D3) e blastocisto (D7 e D8). Em todos os grupos testados foi possível produzir embriões *in vitro* em EJ e EP.

Ao comparar os resultados da taxa de clivagem entre EJ e EP nos diferentes grupos não foi observado diferença estatística com exceção do G30 que teve taxa de clivagem média superior ($p < 0,05$) quando utilizado sêmen colhido por eletroejaculação (EJ) em relação à EP. Esse grupo (G30) também apresentou taxa de blastocistos em D7 maior ($p < 0,05$) em EJ. Em G12 ocorreu o inverso, a taxa de blastocistos em D7 e D8 foi maior ($p < 0,05$) quando utilizado espermatozoides do epidídimo. O G24 apresentou baixos índices em todos os parâmetros avaliados sem diferenças ($p > 0,05$) entre EJ e EP.

TABELA 2- NÚMERO TOTAL DE OÓCITOS (N), MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DA TAXA DE CLIVAGEM (DIA 3), DE BLASTOCISTO (DIA 7) E DE BLASTOCISTO ACUMULADA (DIA 8), DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES COM SÊMEN CRIOPRESERVADO COLHIDO POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-ORQUIECTOMIA (G6, G12, G18, G24, G30).

Grupos	Oócitos (n)		Clivagem (%)		Blastocistos D7 (%)		Blastocistos D8 (%)	
	EJ	EP	EJ	EP	EJ	EP	EJ	EP
G6	159	180	67,5 \pm 9,9 ^{abA}	69,1 \pm 12,6 ^{aA}	15,0 \pm 8,5 ^{abA}	20,9 \pm 14,6 ^{aA}	23,8 \pm 13,5 ^{aA}	27,2 \pm 12,6 ^{aA}
G12	170	159	57,5 \pm 18,7 ^{abA}	64,6 \pm 11,9 ^{abA}	2,4 \pm 3,1 ^{aB}	24,1 \pm 7,2 ^{aA}	4,1 \pm 3,5 ^{bB}	31,2 \pm 12,3 ^{aA}
G18	156	157	55,2 \pm 18,3 ^{abA}	70,8 \pm 14,0 ^{aA}	10,5 \pm 10,7 ^{abA}	21,3 \pm 15,0 ^{aA}	11,8 \pm 10,4 ^{abA}	31,1 \pm 22,5 ^{aA}
G24	159	133	47,1 \pm 7,4 ^{aA}	51,6 \pm 20,1 ^{abA}	1,9 \pm 2,1 ^{aA}	3,2 \pm 4,4 ^{bA}	2,5 \pm 2,0 ^{bA}	4,9 \pm 7,6 ^{bA}
G30	186	182	74,5 \pm 13,2 ^{bA}	40,9 \pm 15,8 ^{bB}	19,7 \pm 7,0 ^{bA}	0,0 \pm 0,0 ^{bB}	26,6 \pm 12,1 ^{aA}	0,6 \pm 1,5 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes na coluna e letras maiúsculas diferentes na linha em um mesmo parâmetro de avaliação indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Na comparação individual entre touros após fertilização *in vitro* em EJ (TABELA 2), o touro em G24 apresentou menor taxa de clivagem e de blastocistos em D7 que o touro em G30 ($p < 0,05$). O touro em G12 apresentou menor taxa de produção de blastocistos em D7 quando comparado com G30. A taxa final de blastocistos no D8 foi significativamente maior para os indivíduos de G30 e de G6, em relação aos de G12 e G24. Desta forma, os reprodutores do G12 e do G24 tiveram menor desempenho na PIVE ($p < 0,05$).

Em relação à comparação dos parâmetros de produção embrionária entre os grupos do epidídimo (EP), observou-se que o G30 apresentou menor taxa de clivagem em relação ao G6 e G18. No D7 e D8 a taxa de blastocistos foi significativamente menor ($p < 0,05$) para G24 e G30 quando comparados aos demais. Na FIGURA 5, estão representadas as imagens dos embriões produzidos em cada grupo (G6, G12, G18, G24 e G30) após sete dias de cultivo *in vitro* dos oócitos fertilizados por espermatozoides obtidos do epidídimo (EP) de touros, após manutenção em temperatura ambiente. Pela visualização do número de embriões, fica claro que em G6, G12 e G18 a fertilização foi mais eficiente. Em G24 e G30, somente poucos ou nenhum blastocisto é observado, não sendo detectadas estruturas condizentes com o estágio de desenvolvimento embrionário esperado.

A menor motilidade total e progressiva em G24 e G30 influenciou a eficácia da seleção espermática para fertilização *in vitro*. Após a centrifugação padrão, a seleção foi incompleta e não houve formação de pellet ideal de espermatozoides nesses grupos. Foi necessário repetir a centrifugação duas a três vezes, e mesmo assim a quantidade de espermatozoides viáveis, que ultrapassou os dois gradientes de seleção foi baixa. Além da menor motilidade progressiva, a grande quantidade de gotas citoplasmáticas nas amostras também dificultou a seleção, pois os espermatozoides ficavam retidos no gradiente de seleção.

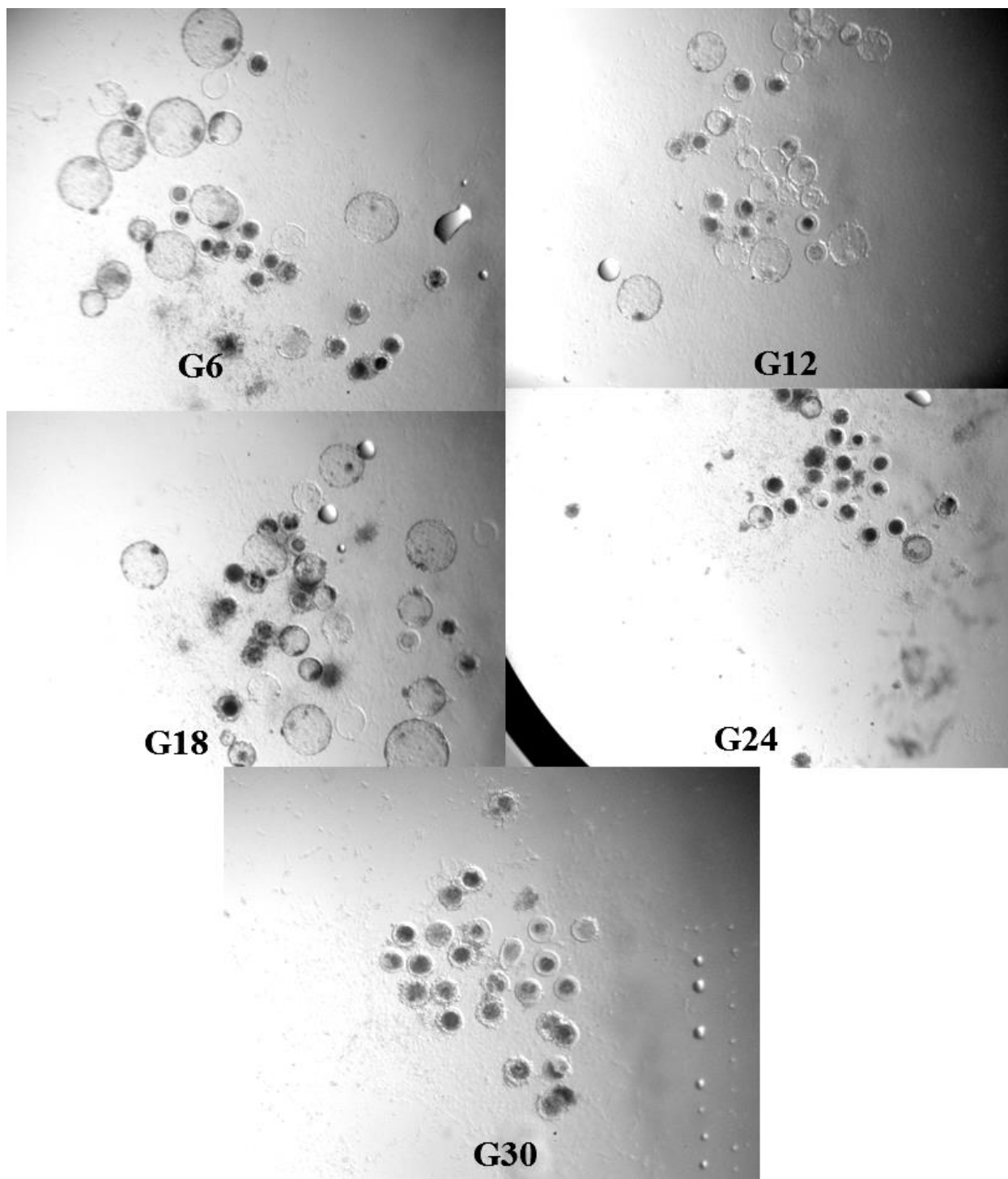


FIGURA 5 – IMAGEM EM ESTEROMICROSCÓPIO (120X) DOS EMBRIÕES BOVINOS EM VÁRIOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM D7 DO CULTIVO *IN VITRO* A PARTIR DO DIA DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO* COM ESPERMATOZOIDES MANTIDOS 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) E 30 HORAS (G30) NA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOUROS (*BOS TAURUS INDICUS*) EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-20°C).

Na comparação dos dados obtidos após oito dias de cultivo *in vitro* dos embriões produzidos após fertilização com espermatozoides do ejaculado e do epidídimo (TABELA 3), houve diferença estatística na taxa de eclosão somente em G18, sendo maior em EP em relação à EJ. Ao avaliar os resultados entre touros em EJ, os embriões não apresentaram diferença na taxa de eclosão em D8. Em EP assim como para os demais parâmetros avaliados, G24 e G30 apresentaram a média da taxa de eclosão em D8 menor que os demais ($p<0,05$).

TABELA 3 - TAXA DE ECLOSÃO EMBRIONÁRIA (D8) E CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS (CTC) DE EMBRIÕES ECLODIDOS (N) EM D8, PRODUZIDOS *IN VITRO* UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO COLHIDO POR ELETROEJACULAÇÃO (EJ) E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (EP) DE TOUROS TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*) EM DIFERENTES PERÍODOS PÓS-ORQUIECTOMIA (G6, G12, G18, G24, G30).

Grupos	Eclosão D8 (%)		CTC (n embriões)	
	EJ	EP	EJ	EP
G6	33,3±28,9 ^{aA}	29,2±21,5 ^{aA}	(13) 205,4 ^{aA}	(15) 280,5 ^{aB}
G12	11,2±19,5 ^{aA}	39,6±26,3 ^{aA}	(n/c)	(11) 191,7 ^b
G18	10,2±19,7 ^{aB}	43,9±20,7 ^{aA}	(8) 190,5 ^{aA}	(15) 226,8 ^{abA}
G24	1,2±1,8 ^{aA}	2,8±6,3 ^{bA}	(n/c)	(n/c)
G30	38,5±41,6 ^{aA}	4,3±5,6 ^{bA}	(9) 225,4 ^a	(n/c)

Letras minúsculas diferentes na coluna e letras maiúsculas diferentes na linha em um mesmo parâmetro de avaliação indicam diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$). Em algumas amostras o número de embriões eclodidos foi insuficiente, não sendo contados (n/c).

Na contagem total de células foi possível comparar os resultados dos grupos EJ e EP dos mesmos touros somente em G6 e G18, sendo que em G18 não houve diferença do número médio de células por embrião ($p>0,05$) nos dois grupos e em G6 os embriões de EP tiveram maior média de células do que os de EJ ($p<0,05$). Quando comparados os grupos entre si, os resultados da contagem de células dos embriões

produzidos em EJ para todos os grupos, não diferiram ($p < 0,05$). Em EP, somente foi possível contar as células em G6, G12 e G18, pois nos demais grupos não houve eclosão de um número suficiente de embriões para contagem. Em G6 a média da contagem total de células foi maior que em G12 ($p < 0,05$) (FIGURA 6). Os resultados de G18 foram semelhantes ao G6 e G12.

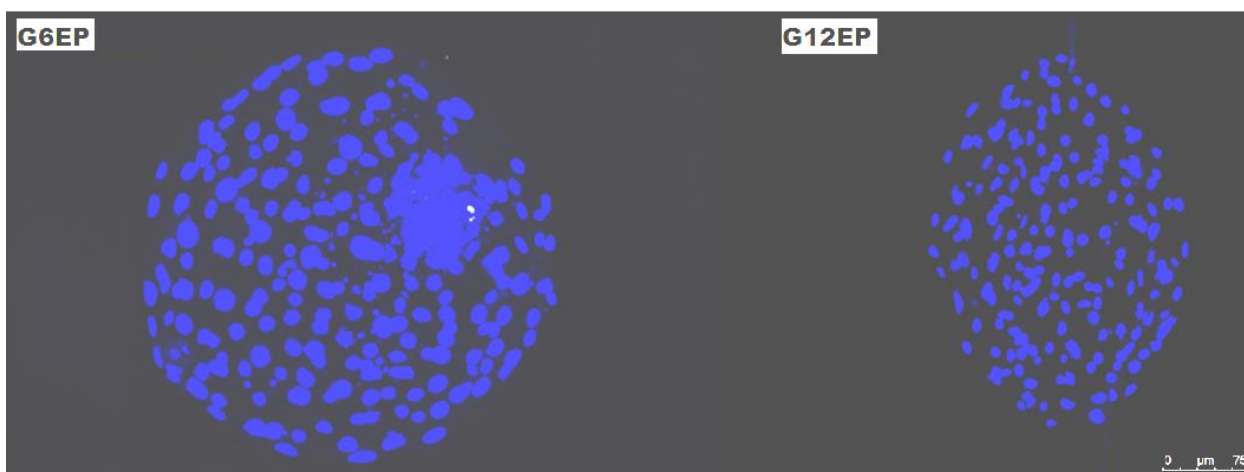


FIGURA 6- FOTOMICROGRAFIA DE EPIFLUORESCÊNCIA (400X), COLORAÇÃO DIFERENCIAL (DAPI) DE DOIS BLASTOCISTOS BOVINOS ECLODIDOS EM D8, FERTILIZADOS *IN VITRO* POR ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO 6 (G6EP) E 12 HORAS (G12EP) EM 18-20°C APÓS ORQUIECTOMIA DE TOUROS ZEBUÍÑOS (*BOS TAURUS INDICUS*). OBSERVA-SE A IMAGEM DA ESQUERDA UM EMBRIÃO COM MAIOR NÚMERO DE CÉLULAS (280,5); E NA DIREITA UM EMBRIÃO COM MENOR NÚMERO DE CÉLULAS (191,7).

Em relação ao teste *in vivo* de fertilidade, após IATF com doses do G30, os espermatozoides com $22,7\% \pm 12,1$ de motilidade total e somente $5,2\% \pm 3,3$ de motilidade progressiva pós-descongelamento, ainda foram competentes na fecundação *in vivo* e obtenção de uma gestação (1/10).

4. DISCUSSÃO

A recuperação e criopreservação de espermatozoides viáveis recuperados do epidídimo, após a morte ou após a orquiectomia de reprodutores importantes ou espécies ameaçadas de extinção representa opção relevante para preservar gametas masculinos e manter bancos de germoplasma. Contudo, existem muitos fatores que influenciam os resultados dessa técnica (KAABI et al., 2003).

Após recuperação e criopreservação dos espermatozoides bovinos obtidos de epidídimos mantidos por diferentes períodos (horas) em temperatura ambiente, e análise dos parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelamento, constatou-se que a motilidade total e progressiva foram menores conforme aumentou o tempo de permanência nos epidídimos anterior à colheita. O G6 e o G18 foram os grupos que apresentaram valores maiores ($p < 0,05$) que o grupo com maior tempo de permanência na cauda do epidídimo. O G30 apresentou valores médios inferiores aos demais, para ambos os parâmetros de motilidade espermática. Quanto maior o tempo, menor a motilidade espermática, pois as alterações teciduais que ocorrem após a interrupção do aporte sanguíneo desencadeiam os processos de autólise prejudicando os espermatozoides e limitando sua viabilidade (SONGSASEN et al., 1998). Outros autores também relatam que a motilidade é o parâmetro mais afetado pelo tempo pós-morte ou pós-orquiectomia (MARTINEZ- PASTOR et al., 2005, WEISS et al., 2008).

Além do tempo, outros fatores importantes que interferem na viabilidade dos espermatozoides do epidídimo são a temperatura e as condições de manipulação (KAABI et al., 2003, TITTARELI et al., 2006). Quando é utilizada temperatura baixa,

entre 4 e 5°C para manipulação de epidídimos, há desaceleração da degradação tecidual e da morte espermática, o que permite a criopreservação de gametas recuperados por até 72 horas pós-orquiectomia de touros (MARTINS et al., 2009) e até 96 horas em equinos (VIEIRA et al., 2013). Ao considerar que esse fato não representa a realidade ambiental, na qual o animal de elevado valor genético ou ameaçado de extinção morre repentinamente, exposto à temperatura ambiente. Apesar de não ser possível controlar exatamente as variações de temperatura em que um reprodutor está exposto após a morte repentina no campo, estabelecer a temperatura intermediária de 18 a 20°C similar à temperatura média anual na maioria das regiões com clima tropical, representa condição mais próxima da realidade. A utilização de gametas obtidos do epidídimo nessas condições em biotecnologias da reprodução, não está descrita na literatura, até o momento.

Os percentuais de motilidade progressiva para os espermatozoides do epidídimo (EP) (G6; G12; G18; G24 e G30) foram baixos, relacionado com a quantidade superior de gotas citoplasmáticas mediais e distais na cauda dos espermatozoides oriundos do epidídimo (BARTH e OKO, 1989), que ocasionam padrão circular de movimentação. Ao considerar as gotas citoplasmáticas na avaliação da morfologia espermática (EMD), os espermatozoides do epidídimo pós-descongelamento de todos os grupos apresentaram percentuais de alterações morfológicas superiores ($p < 0,05$) aos espermatozoides congelados do ejaculado (EJ) (TABELA 1). Por outro lado, sabe-se que essa característica é inerente aos espermatozoides do epidídimo, sendo considerada fisiológica (EHLING et al., 2006) sem prejudicar a fertilização.

Na TABELA 1, a quantidade de células com acrossoma danificado não diferiu entre os grupos testados ($p>0,05$). A redução da fertilidade do sêmen congelado é em grande parte, atribuída à estrutura da membrana plasmática que tem sua função alterada durante o congelamento e descongelamento (PARKS e GRAHAM, 1992). O grupo EJ e o G30 apresentaram menor quantidade de espermatozoides com membranas integras pós-descongelamento em relação aos demais, demonstrando maior fragilidade dessas células. De uma forma geral, a integridade de membrana plasmática foi menor no ejaculado (EJ) do que no epidídimo (EP). A presença ou ausência do plasma seminal reflete na qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento. A motilidade total e a integridade de membrana plasmática e acrossomal é melhor quando os espermatozoides são recuperados do epidídimo, sem plasma seminal, quando comparados aos do ejaculado (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009; MONTEIRO et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012). O plasma seminal influencia a fluidez e a estrutura lipídica da membrana plasmática, tornando-a mais susceptível aos danos durante a criopreservação. Além disso, há variações na composição do plasma entre indivíduos afetando mais ou menos a resistência das membranas durante o congelamento (AURICH et al., 1996).

Contudo, entende-se que a origem dos espermatozoides (ejaculado ou epidídimo) exerce menor influência na viabilidade pós-colheita quando comparada com o tempo e a temperatura de manutenção. A temperatura de refrigeração antes da recuperação reduz os danos na membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides do epidídimo (MARTINS et al., 2009). Há correlação negativa da

maioria dos parâmetros de qualidade dos espermatozoides do epidídimo com o maior tempo pós-morte, em cervídeos selvagens (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005) .

Outro fator importante é a variação da resistência individual dos touros ao processo de criopreservação do sêmen. Na avaliação numérica dos dados pós-descongelamento em G18, os espermatozoides de um dos reprodutores desse grupo apresentou maior crio-resistência. Dividindo-se o valor de motilidade total dos espermatozoides do epidídimo desse touro depois do congelamento (73%) pelo valor pré-congelamento (80%) x 100, é obtido o resultado de 91,2%, comprovando sua alta resistência à criopreservação e elevando a média geral do grupo. Herold et al. (2006), também descreveram que as variações individuais interferem nos parâmetros de viabilidade após a criopreservação de espermatozoides do epidídimo em búfalos.

Nesse estudo foi possível, e pela primeira vez, produzir embriões *in vitro* até oito dias de desenvolvimento, após fertilização de oócitos com espermatozoides colhidos de epidídimos manipulados exclusivamente em temperatura ambiente (18-20°C) em todos os grupos. Isso possibilita o aproveitamento dos gametas, mesmo em condições não ideais de temperatura. A taxa de blastocistos em D7 e D8 e a taxa de eclosão em D8 foram significativamente menores para o G24 e G30 em relação aos demais. De forma geral, a produção embrionária não se alterou até 18 horas após a orquiectomia, havendo queda significativa somente a partir de 24 horas. Isso era esperado, pois os espermatozoides mantidos por mais tempo na cauda dos epidídimos antes da colheita tem sua viabilidade prejudicada, com redução na motilidade, e em consequência, menor habilidade de fertilização. A relação entre a maior motilidade espermática e o sucesso no processo de fertilização e posterior desenvolvimento embrionário foi

demonstrada há anos, sendo o parâmetro espermático com maior interferência nos resultados de produção *in vitro* de embriões (GERRIS e KHAN, 1987).

Em relação a seleção de espermatozoides do epidídimo para a FIV, há poucos relatos na literatura e não existe um protocolo padrão a ser seguido. Shokrollahi et al. (2014) recuperaram mais de 80% de espermatozoides com motilidade progressiva após a seleção com gradiente contínuo Histoprep® e *swim-up*, a partir de epidídimos refrigerados de carneiro no máximo 24 horas após abate, caracterizando condições menos estressantes aos gametas. Chatdarong et al. (2010), compararam três métodos de seleção para espermatozoides do epidídimo de gatos e concluíram que a centrifugação a 300 X g por 20 minutos em gradiente coloidal em camada única foi mais eficiente na separação dos melhores espermatozoides, em relação ao método de *swim-up*. Os autores utilizaram espermatozoides frescos e criopreservados imediatamente após recuperação da cauda do epidídimo. Nesse contexto, avaliando-se cada caso, e por se tratar de células com particularidades específicas, recomenda-se testar diferentes protocolos de seleção espermática, com variações no gradiente de seleção, no tempo e na força de centrifugação. Nesse estudo a preparação das amostras de espermatozoides 20 minutos em banho-maria antes da centrifugação, auxiliou o processo de seleção.

Além da motilidade, a morfologia também é um importante fator para predizer o potencial de fertilização dos espermatozoides, pois a maioria dos defeitos resulta em completa ou parcial exclusão durante a passagem pelo trato genital feminino e principalmente impedem a penetração na zona pelúcida do oócito (SAACKE, 1994). Por não interferir diretamente na fecundação, a grande quantidade de gotas citoplasmáticas mediais e distais parece não ter influência na produção embrionária pós-fertilização com

espermatozoides do epidídimo. O protocolo realizado de descongelar por 30 segundos e depois manter as amostras em banho-maria por 20 minutos permitiu a liberação espontânea de uma parte das gotas citoplasmáticas da região medial e distal da cauda do espermatozoide, reduzindo consideravelmente sua ocorrência nas doses utilizadas na fertilização *in vitro*. Quando localizadas na região proximal também há baixo impacto na eficiência de produção *in vitro* de embriões, sendo mais afetada pela interação de alterações morfológicas e também pela variação entre reprodutores (CARREIRA et al., 2012).

Em relação aos ovários, durante as colheitas no abatedouro, preconizou-se a presença de estruturas (folículos e corpo lúteo) na camada cortical que indicassem ciclicidade, mesmo sem poder determinar o padrão hormonal individual, evitou-se incluir ovários de fêmeas pré-púberes, com menores dimensões de ovários e folículos de qualidade reduzida (NASCIMENTO et al., 2003). A qualidade dos oócitos também influencia os resultados de produção *in vitro* de embriões. Morfologicamente, a maior quantidade e compactação de camadas de células do cumulus, e a homogeneidade do citoplasma, com menos pigmentação e formação de vacúolos, são características que aumentam o potencial de desenvolvimento dos oócitos após a fecundação e em consequência eleva o número de embriões produzidos (STOJKOVIC et al., 2001).

Na comparação da produção embrionária entre EJ e EP dos mesmos touros, os efeitos do tempo e da temperatura nos espermatozoides do epidídimo, reduziram a qualidade espermática e a motilidade progressiva, e foi determinante na quantidade de embriões produzidos por grupo. No G30 os espermatozoides com motilidade total reduzida e somente 5,2% de motilidade progressiva, prejudicaram a seleção e a fertilização, refletindo na menor taxa de clivagem em D3 e menor taxa de blastocistos

em D7 quando comparado com EJ. Além disso, houve número muito menor de embriões nos dias seguintes de cultivo, em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (TABELA 2). Em G12, a taxa de blastocistos (D7 e D8) foi maior para EP do que em EJ, pois ao avaliar individualmente os parâmetros espermáticos desse grupo, houve maior qualidade do sêmen pós-descongelamento quando a origem foi diretamente do epidídimo, interferindo nos resultados. Stout et al. (2012) não encontraram diferenças na produção *in vitro* de blastocistos bovinos entre os espermatozoides colhidos por vagina artificial (ejaculado) e do epidídimo logo após a orquiectomia dos mesmos touros de raça europeia (Holandês). Desta forma, os gametas não sofreram qualquer efeito do tempo e da temperatura, reforçando a importância das condições de manejo nos resultados.

Com os resultados obtidos individualmente, para EJ, é possível concluir que houve variação no potencial de fertilização *in vitro* de cada reprodutor. Shamsuddim e Larsson (1993) também encontraram diferenças na produção de embriões *in vitro* utilizando sêmen de diferentes touros. Em EJ, o efeito touro na produção embrionária também foi observado para o G24 que apresentou resultados ruins na PIVE de forma geral, sem distinção entre EP e EJ. Carreira et al. (2012) também relatam interferências individuais de touros no sucesso da FIV. Há grande variação individual, tanto nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento quanto na produção embrionária dos diferentes reprodutores, havendo touros que são considerados “maus congeladores” e “maus produtores de embriões”. Os resultados reforçam a importância do conhecimento do histórico genético e reprodutivo e testar o potencial de fertilização dos doadores de sêmen para que haja sucesso nos procedimentos de fecundação *in vitro*. Porém, ao se trabalhar com a recuperação de espermatozoides do epidídimo após a morte ou após

orquiectomia, o número amostral é reduzido, por se tratar de casos esporádicos, impossibilitando a escolha de ideais condições.

A produção embrionária em G24 e G30 (TABELA 2), apesar de ser numericamente baixa, tem grande relevância econômica. Apenas um embrião descendente de reprodutor de alto valor genético após morte repentina, tem grande importância genética alto valor agregado, o que justifica a aplicação da biotécnica.

A contagem de células foi escolhida por se tratar de um método não invasivo na determinação da qualidade de embriões bovinos (VAN SOOM et al., 1997). Nesse aspecto, destacaram-se os embriões eclodidos em G6 EP, com média de 280,5 núcleos celulares por embrião, número maior que os demais grupos ($p < 0,05$) o que indica maior qualidade dos embriões. Esse grupo foi superior inclusive ao seu correspondente em EJ. Em alguns grupos (G24 e G30, epidídimo) houve eclosão de um número pequeno de embriões em D8, em decorrência da baixa taxa de produção embrionária e número de blastocistos em D7. Nesses grupos não foi possível realizar a contagem. A avaliação apropriada da qualidade dos blastocistos é imprescindível para que possam ser aproveitados os melhores embriões para transferência, porém embriões produzidos a partir de espermatozoides do epidídimo devem ser aproveitados em sua totalidade, por se tratar da última reserva genética do reprodutor em questão.

Outro fator que pode influenciar os resultados de fertilização, principalmente *in vivo*, é a inexistência de plasma seminal nas amostras de espermatozoides. Há estudos que relacionam a ausência de plasma seminal, após remoção cirúrgica da vesícula seminal em ratos, com alterações na motilidade e no transporte espermático intrauterino, reduzindo as taxas de fertilização de oócitos (PEITZ e OLDS-CLARKE, 1986). Da mesma forma, após a remoção de todas as glândulas acessórias em ratos,

há uma redução na taxa de clivagem dos embriões pós-fertilização e na implantação *in vivo*, ocasionando perdas embrionárias (CHEN e CHOW, 1988). Em um estudo recente sobre os efeitos pós-ejaculatórios do plasma seminal, foram identificadas ações indiretas do fluido seminal em vários fatores que regulam o desenvolvimento embrionário, no trato reprodutivo da fêmea. A excisão cirúrgica da vesícula seminal em ratos, e em consequência a ejaculação sem plasma seminal, reduziu a fertilidade das fêmeas após a cobertura. O número de embriões e a taxa de implantação foram menores, além de atrasar o desenvolvimento dos blastocistos (BROMFIELD et al., 2014). Apesar da ausência do plasma seminal, os espermatozoides do epidídimo são imediatamente diluídos com meios contendo substâncias que dão suporte a sua manutenção após a colheita, o que pode ter reduzido esses efeitos.

Pela reduzida disponibilidade de fêmeas para o programa de inseminação artificial em tempo fixo, somente o G30 foi escolhido para o teste *in vivo*, por se tratar do conjunto de espermatozoides que sofreram por mais tempo o efeito prejudicial da temperatura ambiente. Partiu-se da hipótese de que se houvesse prenhez após inseminação com espermatozoides desse grupo, a probabilidade de ocorrer o mesmo nos demais seria alta, sem descartar a importância de testá-los futuramente. Mesmo com menor motilidade total e progressiva, menor integridade de membrana plasmática e maior tempo de manutenção na cauda do epidídimo anterior a colheita, ainda foi possível produzir uma gestação (1/10) após IATF, confirmando seu potencial de fertilização *in vivo*. Costa et al. (2011) utilizaram o cio natural de dez vacas para inseminação com espermatozoides recuperados de epidídimos refrigerados (5°C) de touros, e obtiveram duas gestações. O cio natural e a refrigeração dos epidídimos são fatores favoráveis ao resultado. No presente estudo há o relato, pela primeira vez, da

utilização de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo de novilhas com espermatozoides de epidídimos mantidos em temperatura ambiente com resultado positivo de uma prenhez. Esse resultado é extremamente importante, pois mesmo com o comprometimento da motilidade total e progressiva, os espermatozoides foram competentes na fertilização *in vivo*.

Após a morte de um reprodutor expoente há a valorização do seu material genético e também dos seus descendentes. O valor da dose de sêmen, por exemplo, aumenta consideravelmente. Há relatos na história de reprodutores bovinos que, quando morreram, tiveram suas doses de sêmen comercializadas por altos valores de R\$ 1.000 a R\$ 1.400 (ANDRADE, 2009).

Com os resultados obtidos nesse estudo, torna-se viável criar uma janela de oportunidade em condições mais próximas às reais, para o aproveitamento do material genético de reprodutores valiosos de espécies domésticas, selvagens e no homem após morte repentina ou outras condições adversas em que não seja possível obter gametas de forma convencional. A temperatura ambiente utilizada ($19 \pm 1^{\circ}\text{C}$) é próxima à temperatura média anual onde foi realizado o estudo (estado do Paraná), entre 19 e 20°C, com predomínio de clima tropical (IAPAR, 2016). Considera-se interessante reproduzir essa pesquisa em diferentes condições climáticas, testando temperaturas superiores e inferiores às propostas nesse estudo, refletindo as variações térmicas expressivas no território nacional, ou em outros países. Os três fatores que mais influenciaram os resultados de viabilidade espermática e produção *in vitro* de embriões foram: tempo pós-orquiectomia, temperatura de manutenção dos epidídimos, e variações individuais.

5. CONCLUSÃO

- Foi possível criopreservar com sucesso, os espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros, quando mantidos em temperatura ambiente até 30 horas após orquiectomia;
- A motilidade total, progressiva e integridade de membrana plasmática foram os parâmetros de viabilidade espermática que foram mais afetados pelo tempo pós-orquiectomia, sendo menores em G24 e G30 em relação aos demais ($p<0,05$);
- Na produção *in vitro*, foi possível obter embriões viáveis em todos os grupos (G6; G12; G24; G30). O número total de blastocistos, e a taxa de eclosão foram menores em G24 e G30. Os embriões obtidos após fertilização com espermatozoides do epidídimo em G6 apresentaram maior média (280,5) ($p<0,05$) de células que os demais;
- No teste *in vivo* os espermatozoides viáveis em G30 foram eficientes na fertilização e obtenção de uma prenhez após inseminação artificial em tempo fixo;
- Desta forma, pela primeira vez foi possível produzir embriões *in vitro* e uma prenhez após IATF, a partir de espermatozoides do epidídimo mantidos até 30 horas em temperatura ambiente (18 à 20°C) o que representa condição importante na manipulação de gametas da reserva epididimária.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo de Doutorado, ao apoio dos laboratórios da UFPR, PUCPR e da UNESP-Botucatu, e toda equipe que se dedicou diariamente para que esse trabalho fosse executado.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. **Vale mais morto que vivo**. Dinheiro Rural. Disponível em: <<http://dinheirorural.com.br/secao/agrofinancas/vale-mais-morto-do-que-vivo>>, Acesso em: Janeiro/2016.
- ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; ULLAH, N.; AKHTER, S. Cryopreservation of Sahiwal Bull Epididymal Spermatozoa. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 42, n. 6, p. 741-743, 2010.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 791-797, 1996.
- BARTH, A.D. e OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BERTOL, M. A. F. **Viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Animal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, PR.
- BERTOL, M.A.F.; WEISS, R.R.; FUJITA, A.S.; KOZICKI, L.E.; DE ABREU, A.C.M.R.; PEREIRA, J.F.S. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1658–1663, 2014.
- BERTOL, M.A.F.; WEISS, R.R.; TOMAZ-SOCCOL, V.; KOZICKI, L.E.; FUJITA, A.S.; DE ABREU, R.A.; GREEN, K.T. 2013. Viability of Bull Spermatozoa Epididymis Stored at 18-20°C Collected from the epididymis stored at 18-20°C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 777–783, 2013.
- BROMFIELD, J.J.; SCHJENKEN, J.E.; CHIN, P.Y.; CARE, A.S.; JASPER, M.J.; Robertson, S.A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2200-2205, 2014.
- CARREIRA, J.T.; MINGOTI, G.Z.; RODRIGUES, L.H.; SILVA, C.; PERRI, S.H.; KOIVISTO, M.B. Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and in-vitro

embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2012.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J.M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v.73, n. 9, p. 1284–1292, 2010.

CHEN, S.U.; SHIEH, J.Y.; WANG, Y.H.; CHANG, H.C., H.O., H.N.; YANG, Y.S. Pregnancy achieved by intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved vasal-epididymal sperm from a man with spinal cord injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 79, p. 218–221, 1998.

CHEN, W.S.O, H. e CHOW P.H. Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. **Journal of reproduction and fertility**, v. 84, p. 341-344, 1988.

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F.; FRANCO, V.O.; REZENDE, L.O.F.; SERENO, J.R.B.; CAMPOS, H.C.F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciência Rural**, v. 4, n. 5, p. 869-874, 2011.

DROUINEAUD, V.; SAGOT, P.; FAIVRE, L.; MICHEL, F.; JIMENEZ, C. Birth after intracytoplasmic injection of epididymal sperm from a man with congenital bilateral absence of the vas deferens who had a robertsonian translocation. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 1649–1651, 2003.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; DE PAZ, P., et al. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 738–753, 2007.

GALLI, C. e LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371–9, 1996.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J.J.; RAMÓN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R., et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 160-168, 2009.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from *post-mortem* rams. **Theriogenology**, v. 41, p. 2003, 1994.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the criopreservation process. **Theriogenology**, p. 1151–1162, 1994.

GUERRIS, J.; KHAN, I. Correlation Between *In vitro* Fertilization and Human Sperm Density and Motility. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 48–54, 1987.

GUIMARÃES, T.; LOPES, G.; FERREIRA, P.; LEAL, I.; ROCHA, A. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-2, p. 85-89, 2012.

HARRISON, R.A.P. e VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using TriladylTM or AndroMed[®]. **Theriogenology**, v. 66, p. 1123–1130, 2006.

IGBOELI, G. e FOOTE, R.H. Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p. 1703–1705, 1968.

Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). **Cartas climáticas do Paraná**. Temperatura média anual. Disponível em:
<<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=604>>, Acesso em: Janeiro/2016.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, p. 1249–1259, 2003.

LOPES, G.; SOARES, L.; FERREIRA, P.; ROCHA, A. Tris-Egg Yolk-Glycerol (TEY) Extender Developed for Freezing Dog Semen is a Good Option to Cryopreserve Bovine Epididymal Sperm Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 97–103, 2015.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A. R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, p. 24–40, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAREZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471–485, 2006.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P.M.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 50–57, 2009.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELLAQUA, J. A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 197–201, 2011.

NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, L. N.; SALES, A.; VIANA, J. H. M. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40. p. 126-132, 2003.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222.

PEITZ, B.; OLDS-CLARKE, P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 3, p. 608–617, 1986.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 6, p. 45–50, 1994.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. In Vitro Development of Bovine Embryos after Fertilization using Semen from Different Donors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 28, p. 77–84, 1993.

SHOKROLLAHI, E.; BARATI, F.; GOORANINEJAD, S. Efficacy of Histoprep® gradient for isolating ovine epididymal sperm. **Small Ruminant Research**, v. 119, p.96–99, 2014.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S.P. Birth of Live Mice Derived by In Vitro Fertilization With Spermatozoa Retrieved Up to Twenty-Four Hours After Death. **Journal of Experimental Zoology**, v. 280, p. 189–196, 1998.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLFI, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and development capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

STOUT, M.A.; SAENZ, J.R.; CHENEVERT, J.F.; GENTRY, G.T.; BONDIOLI, K.B.; GODKE, R.A. Cryopreserved Ejaculated and epididymal sperm collected from the same Holstein bulls used for in vitro fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 261–261, 2012.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1637-1640, 2006.

TURRI, F.; MADEDDU, M.; GLIOZZI, T.M.; GANDINI, G.; PIZZI, F. Influence of Recovery Methods and Extenders on Bull Epididymal Spermatozoa Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 712–717, 2012.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 47–56, 1997.

VIEIRA, L.A.; GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; AVILÉS-LÓPEZ, K.; MATÁS, C. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 280-288, 2013.

WEISS, R.R.; MURADÁS, P.R.; GRANEMAN, L.C.; MEIRA, C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 356, 2008. Abstract.

ANEXO 1- Fluxograma da técnica de recuperação e aproveitamento de espermatozoides de epidídimos de touros, quando mantidos em temperatura ambiente (18-20°C) pós-orquiectomia ou pós-morte.

